1/G.
Spec. Copy.

ARCHIEF

VOOR DE

Suikerindustrie in Nederlandsch-Indië

□ □ □

MEDEDEELINGEN VAN HET PROEFSTATION VOOR DE JAVA-SUIKERINDUSTRIE.

IMPERIAL BUREAU
14 MAR. 1924

□ □
□

JAARGANG 1923, No. 9.

ONDERZOEKINGEN AANGAANDE DE MIKROFLORA, AANWEZIG IN NORMAAL EN SEREHZIEK SUIKERRIET

DOOR

Dr. C. A. H. VON WOLZOGEN KÜHR.

N. V. Boekhandel en Drukkerij
v/h H. van Ingen — Soerabaja.

MEDEDEELINGEN VAN HET PROEFSTATION VOOR DE JAVA-SUIKERINDUSTRIE.

Jaargang 1923, No. 9.

ONDERZOEKINGEN AANGAANDE DE MIKROFLORA, AANWEZIG IN NORMAAL EN SEREHZIEK SUIKERRIET

door

Dr. C. A. H. VON WOLZOGEN KÜHR.

Inleiding.

Tijdens mijn werkzaamheid als mikrobioloog aan de Cultuurafdeeling van het Proefstation voor de Javasuikerindustrie te Pasoeroean, kreeg ik einde 1917 de opdracht, een hernieuwd onderzoek in te stellen naar de al of niet parasitaire natuur van de serehziekte van het suikerriet

Tot het instellen van een dergelijk onderzoek bestond alle aanleiding, daar men omtrent de oorzaak der serehziekte nog steeds geheel in het duister tastte, niettegenstaande talrijke, hoogst bekwame onderzoekers aan dit probleem reeds intensieve aandacht hadden geschonken.

Deze laatste omstandigheid zou er nu toe kunnen leiden, dat men reeds tevoren aangaande het resultaat van iedere nieuwe poging om in bedoelde aangelegenheid meerdere helderheid te brengen, uiterst sceptisch gestemd zou zijn.

Maar hiertegenover mocht worden gewezen op het min of meer hoopvol stemmende feit, dat het laatste experimenteele onderzoek naar het eventueele bestaan van een specifiek mikro-organisme als verwekker der serehziekte reeds uit 1898 dateerde. De groote vooruitgang, die èn de phytopathologie, in het bijzonder de kennis der bacterieele plantenziekten, èn de mikrobiologische techniek sinds genoemd jaar heeft gekenmerkt, scheen nu het instellen van een hernieuwd onderzoek volkomen te rechtvaardigen.

Dit inzicht werd ten volle gesteund door de volgende, uit 1914 dateerende uitspraak van den vermaarden phytopatholoog Erwin F. Smith: [1]) „None of the Dutch writers have brought any con-

[1]) Erwin F. Smith, Bacteria in Relation to Plant Diseases. Dl. 3, 1914, pag. 77.

clusive evidence as to the parasitic nature of sereh, i.e., they have not established the constant presence of any particular organism in the diseased cane; neither have they shown that the disease can be induced in sound cane by inoculating any particular organism. *At the same time no thorough bacteriological study appears to have been made.*" [1]).

De mij verleende opdracht beoogde nu zoo mogelijk eenigermate in deze leemte te voorzien. Het in te stellen onderzoek viel nu automatisch uiteen in de twee volgende onderdeelen:

1. De beantwoording van de vraag, of in het serehzieke riet bepaalde mikro-organismen zijn aan te treffen.
2. De beantwoording van de vraag, of één van de aldaar eventueel aangetroffen mikroben als de specifieke verwekker der serehziekte mag worden beschouwd.

Dat met het eerste deel van het onderzoek niet zou mogen worden volstaan, is duidelijk op grond van de twee volgende overwegingen.

In de eerste plaats hebben de onderzoekingen der latere jaren aangetoond, dat in strijd met het in den aanvang van deze eeuw overheerschende inzicht, ook de weefsels van uiterlijk normale planten geenszins ten allen tijde vrij van mikro-organismen zijn. In Hoofdstuk I zal hieromtrent in een nadere beschouwing worden getreden. Alleen reeds op grond van dit gezichtspunt is het geenszins noodzakelijk, dat de uit zieke planten geïsoleerde mikroben in oorzakelijk verband tot het ziekteverschijnsel staan. Intusschen volgt hieruit, dat het in hooge mate gewenscht is, naast het mikrobiologisch onderzoek van de zieke planten een parallel onderzoek van de uiterlijk normale planten te verrichten, om dan op grond hiervan tot de al of niet aanwezigheid van voor het ziektebeeld specifieke mikroben te kunnen besluiten. Met de wenschelijkheid van een dergelijk parallel onderzoek werd dan ook ten volle rekening gehouden.

In de tweede plaats echter kan ook een dergelijk onderzoek niet tot beslissende uitkomsten leiden. Immers de mogelijkheid moet ten volle worden erkend, dat de aanwezigheid eener specifieke mikroflora in de zieke planten niet de oorzaak, maar veel meer het gevolg van het ziekteproces en derhalve een verschijnsel van secundairen aard is.

Het is dan ook op grond van dit alles, dat Erwin F. Smith [2]) in navolging van Koch's klassieke beschouwingen over de infectie-

[1]) Cursiveering van mij.
[2]) Erwin F. Smith. Bacteria in Relation to Plant Diseases. Dl. 1, 1905, pag. 9.

ziekten bij dier en mensch, in zijn standaardwerk over bacteriëele plantenziekten terecht den eisch stelt, dat, alvorens tot de parasitaire natuur eener plantenziekte mag worden besloten, aan de volgende voorwaarden moet zijn voldaan:

1. de mikrobe moet geregeld in de zieke plant voorkomen;
2. de mikrobe moet uit de zieke weefsels van de plant zijn geïsoleerd en nauwkeurig in verschillende media op haar eigenschappen onderzocht;
3. door inenting van een reinkultuur dezer mikrobe in gezonde planten moeten de karakteristieke symptomen van de ziekte bij de ingeënte planten worden teweeggebracht;
4. in deze planten moet de mikrobe aanwezig zijn en daaruit weer te isoleeren, terwijl door kultuur van de bij reïsolatie verkregen mikrobe in verschillende media met volkomen zekerheid moet zijn vastgesteld, dat dit gereïsoleerde mikroorganisme hetzelfde is als dat, hetwelk voor de inenting werd gebruikt.

Bij mijn onderzoek heb ik mij geheel gehouden aan deze door SMITH geformuleerde eischen.

Uit het hierachter volgende verslag mijner proefnemingen zal blijken, dat deze er wel toe geleid hebben een specifieke mikroflora voor het serehziek suikerriet aan te wijzen, doch het verder onderzoek heeft geleerd, dat het uit dit riet door mij geïsoleerde organisme niet voldoet aan de bovengenoemde voorwaarden, op grond waarvan het als de verwekker der serehziekte zou mogen worden beschouwd.

Aangaande de oorzaak der serehziekte is dus door mijn onderzoekingen geen nieuw licht verspreid.

De te beschrijven proeven blijven echter, naar het mij voorkomt, haar belang behouden als de eerste, met behulp van een aan de eischen van den tijd beantwoordende techniek, verrichte onderzoekingen naar de mikroflora van het normale en serehzieke suikerriet. Met de aanwezigheid van een mikroflora zoowel in het uiterlijk normale als in het serehzieke suikerriet toch, zal door degenen, die zich in de toekomst met het onderzoek naar parasitaire ziekten van deze zoo belangrijke kultuurplant zullen bezighouden, zeker volop rekening gehouden moeten worden.

In overeenstemming met het boven uiteengezette zal nu in Hoofdstuk I een overzicht worden gegeven van hetgeen vroegere onderzoekingen geleerd hebben over het al of niet voorkomen van mikro-organismen in uiterlijk normale planten.

Daarna zullen in Hoofdstuk II de vroegere onderzoekingen betreffende de serehziekte van het suikerriet besproken worden, waarbij in het bijzonder de meeningen over de al of niet parasitaire natuur dezer ziekte zullen worden naar voren gebracht.

Hierop volgt dan het verslag van de door mij verrichte proefnemingen en de gevolgtrekkingen, die zich op grond van de verkregen uitkomsten laten afleiden.

HOOFDSTUK I.

Vroegere onderzoekingen over het voorkomen van mikroben in uiterlijk normale planten.

§ I. *Het inwendige van levende plantenweefsels bevat als regel geen mikro-organismen.*

Van het oogenblik af, dat PASTEUR de alomtegenwoordigheid der mikro-organismen in de natuur in een helder daglicht stelde, is de vraag aan de orde geweest, in hoevere ook in het inwendige der weefsels van hoogere organismen mikroben aanwezig zijn.

PASTEUR's tegenstanders, zooals BÉCHAMP en HALLIER, geloofden in de mogelijkheid eener transformatie van bepaalde protoplasmatische bestanddeelen der hoogere organismen in bacteriën en gisten. Deze meening werd ook door FRÉMY en TRÉCUL verdedigd.

Hiertegenover stelde PASTEUR [1]) in zijn in 1876 verschenen „Etudes sur la bière" vast, dat het inwendige van gezonde planten vrij is van mikro-organismen. PASTEUR experimenteerde met druiven, waarvoor hij aantoonde, dat uit het inwendige daarvan verkregen sap steriel blijft, zoolang men het onder uitsluiting van van buiten komende kiemen bewaart. Zijn leerling CHAMBERLAND [2]) toonde in 1880 aan, dat onmiddellijk na het oogsten uit de peulen genomen boonen eveneens vrij van mikroben zijn.

In 1885 stelde LAURENT [3]) vrij uitgebreide onderzoekingen op dit gebied in. Deze leidden hem tot de volgende woordelijk aangehaalde uitspraak: „Il n'y a pas d' organismes étrangers dans les tissus végétaux à l'état normal".

Talrijke onderzoekingen werden sindsdien verricht om uit te maken, of de afwezigheid van vreemde kiemen in het weefsel van uiterlijk normale planten al dan niet algemeen geldig is.

GALIPPE [4]) kwam in 1887 tot het resultaat, dat nagenoeg zonder uitzondering alle door hem onderzochte groenten in haar inwendige bacteriën bevatten. Bij herhaling dezer proeven door FERNBACH [5])

---

1) L. PASTEUR. Etudes sur la bière, etc., 1876, pag. 56.

2) CH. E. CHAMBERLAND. Thèse, Paris, 1880, pag. 35.

3) E. LAURENT. Sur la prétendue origine bactérienne de la diastase. Bull. de l'Académie Royale des Sciences, des Lettres et Beaux-Arts de Belgique, 3me Séries, T. 10, 1885, pag. 38.

4) V. GALIPPE. Note sur la présence de micro-organismes dans les tissus végétaux. Compt. Rend. hebd. de la Soc. de Biologie, Paris, 1887, pag. 410.

5) A. FERNBACH. De l'absence des microbes dans les tissus végétaux. Ann. de l'Institut Pasteur, 2 année, Paris, 1888, pag. 567.

in 1888, vond deze slechts in ruim 6% der onderzochte gevallen bacteriën. Deze positieve uitkomsten, evenals het door GALIPPE verkregen resultaat, meent FERNBACH geheel aan infecties van buitenaf te moeten toeschrijven, waarom hij wijst op de belangrijke rol, die luchtinfecties bij dergelijke proeven kunnen spelen. FERNBACH komt dan ook tot de slotsom, dat het gezonde plantenweefsel een volmaakt filter vormt tegen de in de omgeving aanwezige mikro-organismen. Slechts op geheel accidenteele wijze kunnen deze in het inwendige van het plantenweefsel doordringen.

A. DI VESTEA [1]) herhaalde in 1888 eveneens GALIPPE's proeven met het resultaat, dat in de door hemzelf verzamelde planten geen bacteriën of andere mikro-organismen te vinden waren, indien het onderzoek onmiddellijk na het inzamelen plaats vond. Werden deze planten echter eenigen tijd in de open lucht bewaard of bezigde hij voor het onderzoek op de markt gekochte planten, dan bleken zij niet vrij van mikro-organismen te zijn, een uitkomst, welke geen verwondering kan verwekken.

In hetzelfde jaar verscheen evenwel weer een verhandeling van BERNHEIM [2]), waarin deze onderzoeker mededeelde, dat hij in het inwendige van de zaden van verschillende graansoorten bacteriën had aangetroffen. Deze uitkomst werd intusschen weerlegd door de proefnemingen van LEHMANN [3]) en BUCHNER [4]). Beide onderzoekers kwamen onafhankelijk tot de conclusie, dat het inwendige van normale plantenzaden vrij van mikro-organismen is.

In 1891 toonde KRAMER [5]) aan, dat het inwendige van den aardappel vrij van mikroben is.

Tot een analoge gevolgtrekking kwam RUSSELL [6]) is 1892 bij het onderzoek van verschillende planten en zoo ook HILTNER [7]), die gezonde zaden vrij van mikroben vond.

Bij KOCHS' [8]) proeven in 1894 werd gewezen op het feit, dat

[1]) A. DI VESTEA. De l'absence des microbes dans les tissus végétaux. Ann. de l'Institut Pasteur, 2 année, Paris, 1888, pag. 670.

[2]) H. BERNHEIM. Die parasitären Bacterien der Cerealien. Münchner med. Wochenschrift. 1888, pag. 743 en 767.

[3]) K. B. LEHMANN. Erklärung in Betreff der Arbeit von Herrn Dr. HUGO BERNHEIM: „Die parasitären Bakterien der Cerealien." Münch. med. Wochenschr. 1889, pag. 110.

[4]) H. BUCHNER. Notiz betreffend die Frage des Vorkommens von Bacterien in normalen Pflanzengewebe. Münch. med. Wochensch. 1888, No. 52, pag. 906.

[5]) E. KRAMER. Bakteriologische Untersuchungen über die Nassfäule der Kartoffelknollen. Oesterreichisches landw. Centralbl. I, Heft 1. 1891.

[6]) H. L. RUSSELL. Botanical Gazette. Vol. XVIII, 1892, pag. 93.

[7]) L. HILTNER. Zie: Bacteria in Relation to Plant Diseases, by ERWIN F. SMITH, Dl. 2, 1911 pag. 26.

[8]) KOCHS. Giebt es ein Zellenleben ohne Mikro-organismen? Biologisches Centralbl. Bd. XVI, 1894, No. 14. Ref. in Centralbl. f. Bakt. Bd. XVI, 1894, pag. 633.

planten, gekweekt uit zaad, dat van aanhangende kiemen is bevrijd, in een steriele omgeving tot vollen wasdom kunnen komen en dus voor haar ontwikkeling geheel onafhankelijk van mikro-organismen zijn.

Op grond van al deze waarnemingen kan men dan ook slechts instemmen met de uitspraak van SMITH [1]), wanneer deze zegt: „We now believe that bacteria do not occur normally in the interior of sound plants", waarbij in plaats van bacteriën ook het ruimere begrip mikro-organismen kan treden.

Het standpunt, dat het normale levende plantenweefsel als regel vrij van mikroben is, gecombineerd met het feit, dat sinds de tweede helft der vorige eeuw de overtuiging steeds meer ingang vond, dat tal van ziekten van hoogere planten een gevolg waren van het binnendringen van verschillende mikro-organismen, leidde nu aanvankelijk tot de opvatting, dat zulk een binnendringen ook altijd ziekelijke afwijkingen in de planten teweeg moest brengen. Althans voor zoover de betreffende kiemen in de planten niet snel te gronde gingen.

Intusschen toonde RUSSELL in zijn boven geciteerde verhandeling reeds aan, dat de feiten met deze opvatting geenszins ten allen tijde in overeenstemming zijn. Hij infecteerde verschillende plantenweefsels voorzichtig met bacteriën-suspensies en stelde vast dat deze bacteriën zich in het weefsel geruimen tijd (70 dagen en langer) konden handhaven, zonder dat daarvan waarneembare afwijkingen in de plant het gevolg waren. Daarbij kon hij tevens vaststellen, dat de bacteriën zich somtijds over niet onbelangrijke afstanden in het betreffende plantenorgaan konden verspreiden.

RUSSELL wijst er nu op, dat een dergelijke, met infectie gepaard gaande, na eenigen tijd niet meer waarneembare verwonding ook in de natuur geenszins zeldzaam zal zijn en dat dit ten gevolge zal hebben, dat in sommige gevallen, in afwijking van den regel, de onderzochte plantenweefsels niet vrij van mikro-organismen zullen worden gevonden.

Het is waarschijnlijk, dat hierdoor verschillende van de afwijkende resultaten, welke door onderzoekers als GALIPPE werden verkregen, zijn te verklaren.

Men moest dus constateeren, dat door de proefnemingen van RUSSELL de mogelijkheid van de aanwezigheid eener accidenteele

[1]) ERWIN F. SMITH. Bacteria in Relation to Plant Diseases, Dl. 2, 1911, pag. 23.

mikroflora in levende plantenweefsels van uiterlijk geheel normale planten is komen vast te staan.

Tot overeenkomstige beschouwingen voor dierlijke weefsels zijn in de laatste jaren ook andere onderzoekers als LUMIÈRE [1]) en BUCHNER [2]) gekomen. Het uitgangspunt van hun onderzoekingen was de in 1918 door PORTIER in zijn boek: „Les symbiotes" opgestelde merkwaardige symbionten-hypothese [3]). Volgens dezen onderzoeker zouden de mitochondriën van het celplasma der dierlijke en plantaardige organismen niets anders zijn dan bacteriën, welke in symbiose met de cellen der hoogere organismen zouden leven.

Met behulp van deze hypothese meent PORTIER nieuw licht te kunnen werpen op belangrijke vraagstukken als dat der avitaminose, van den kanker, der bevruchting en in het bijzonder ook der parthenogenese. Al deze verschijnselen zouden in verband zijn te brengen met de aan- resp. afwezigheid der symbiotische bacteriën.

Indien deze theorie voldoend experimenteel zou zijn gesteund, zou zij vanzelf sprekend een omwenteling beteekenen in het boven geresumeerde inzicht over de afwezigheid van mikro-organismen in levende weefsels van hoogere organismen.

Intusschen zijn PORTIER's min of meer phantastische beschouwingen aan een scherpe critiek onderworpen door LUMIÈRE en BUCHNER. Hun bestrijding komt in de eerste plaats hierop neer, dat PORTIER volgens hen in gebreke is gebleven het bewijs te leveren, dat de mitochondriën inderdaad bacteriën-karakter bezitten. Weliswaar heeft PORTIER in sommige gevallen inderdaad bacteriën uit de onder aseptische voorwaarden geïsoleerde weefsels gecultiveerd, maar LUMIÈRE houdt het voor zeker, dat de door PORTIER geïsoleerde symbionten voortkomen uit saprophytische sporen, welke in de normale weefsels der gewervelde dieren aanwezig kunnen zijn. Door speciale proefnemingen bewees LUMIÈRE, dat inderdaad tal van saprophytische kiemen in levende weefsels van hoogere dierlijke organismen kunnen blijven bestaan. De mitochondriën zouden protoplasma-kolloïden zijn, welke slechts een vage gelijkenis, wat den vorm betreft, met mikroben hebben. Overigens zouden zij daarvan geheel afwijken.

Voor ons is in dit verband van belang, dat zoowel LUMIÈRE als

[1]) A. LUMIÈRE. Le Mythe des Symbiotes, 1919.

[2]) P. BUCHNER. Tier und Pflanze in intrazellularer Symbiose, 1921, pag. 401.

[3]) Het is mij niet mogen gelukken het oorspronkelijke geschrift van PORTIER, blijkbaar in zeer beperkte oplage verschenen, onder oogen te krijgen. Het omtrent zijn hypothese medegedeelde werd ontleend aan de boven geciteerde geschriften van LUMIÈRE en BUCHNER.

Buchner op grond van een en ander toch tot de slotsom komen, dat de klassieke opvatting der bacteriologen van de onvoorwaardelijke asepsis van de gezonde organen moet worden herzien. [1]) Met andere woorden erkennen ook deze onderzoekers de mogelijkheid van het bestaan eener accidenteele mikroflora in levende weefsels van uiterlijk geheel normale hoogere organismen.

§ 2. *Symbiose van hoogere planten met daarin voorkomende mikro-organismen.*

Behalve dat dus hier en daar in de literatuur weleens melding wordt gemaakt van het voorkomen eener accidenteele mikroflora in levende plantenweefsels, werden geleidelijk steeds meer gevallen bekend betreffende het min of meer regelmatig voorkomen van specifieke mikro-organismen in levende plantenweefsels, zonder dat van dit voorkomen een ongunstige invloed uitging op den algemeenen toestand van de betrokken plant.

Integendeel kon althans in sommige gevallen met zekerheid worden vastgesteld, dat de plant bepaalde voordeelen aan de aanwezigheid van het mikro-organisme ontleende. Daar omgekeerd de plant de ongestoorde ontwikkeling van het mikro-organisme in haar weefsels tot op zekere hoogte scheen te bevorderen, sprak men in dergelijke gevallen van symbiose, waaronder men dan verstond een samenleven van de twee organismen op zoodanige wijze, dat beide partijen daar wederkeerig door werden gebaat.

Een kort overzicht van de belangrijkste tot nu toe bekend geworden gevallen van symbiose van hoogere planten met mikroben moge hieronder volgen, omdat eruit blijkt, hoe in zeer uiteenloopende plantenfamiliën de aanwezigheid van mikro-organismen in de weefsels van alleszins normaal zich ontwikkelende planten is vastgesteld.

Het meest bekende voorbeeld eener dergelijke symbiose is ongetwijfeld die tusschen de verschillende soorten van Leguminosae en de daaruit door Beijerinck [2]) voor de eerste maal geïsoleerde Bact. radicicola. Andere gevallen betreffen het voorkomen van endophytisch levende Anabaenasoorten bij Azolla filiculoides, door Oes [3])

[1]) Terloops zij hier nog vermeld, dat bij een onderzoek van P. A. van Driest gebleken is, dat ook het spierweefsel van verschillende vischsoorten *niet steriel* is, ook al wordt het vleesch direct na den dood aan de dieren ontnomen. Zie: Conserveering van visch door kunstmatige koude. No. 25. Mededeelingen en verslagen van de visscherij-inspectie. 's-Gravenhage 1919. Eerste rapport pag. 39.

[2]) M. W. Beijerinck. Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen. Verzamelde geschriften. Dl. 2, pag. 155.

[3]) A. Oes. Uber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Azolla. Zt. f. Bot. Bd, 5, 1913, pag. 145.

onderzocht, en van Mycobacterium Rubiacearum in de Rubiaceae, door Von Faber [1]) bestudeerd. In al deze gevallen moet de beteekenis dezer symbiosen voor de hoogere plant naar alle waarschijnlijkheid gezocht worden in de binding van de vrije afmosferische stikstof door het betreffende mikro-organisme, tengevolge waarvan deze stikstofbron indirect ook aan de voeding der hoogere plant ten goede komt.

Nog duister is echter de beteekenis der symbiose van Ardisia crispa en de daarin voorkomende Bac. foliicola, welke door Miehe [2]) is onderzocht. Naast genoemde bacteriesoort werd uit deze plant ook nog een door Miehe als B. repens aangeduide mikrobe aangetroffen, welke waarschijnlijk slechts een van geen principiëel belang zijnde begeleidster van Bac. foliicola is.

Evenmin verklaard is de symbiose van Lolium temulentum met een daarin voorkomende schimmel, welke het eerst door Guerin en Vogl werd vastgesteld. Het ontwikkelingsproces van de schimmel in de plant werd door het onderzoek van Freeman [3]) geheel opgehelderd. Volgens Hannig [4]) is hierbij intusschen van binding der vrije stikstof door het mikro-organisme geen sprake.

Tot de gevallen van symbiose moet dan ook nog worden gerekend het innige samenleven van de wortels van een zeer groot aantal zeer uiteenloopende hoogere planten met verschillende schimmelsoorten, welk verschijnsel men als mycorrhiza pleegt aan te duiden. Daarbij ontwikkelt de schimmel zich somtijds in, dohc meestal aan de oppervlakte van de plantenwortels, op grond waarvan men onderscheid maakt tusschen endotrophe en ektotrophe mycorrhiza. In dit verband is vooral de endotrophe mycorrhiza, waarbij de schimmel dus in de cellen leeft, van belang.

Van de gevallen van endotrophe mycorrhiza is vooral het samenleven van schimmelsoorten met verschillende vertegenwoordigers van de familie der Orchidaceae goed onderzocht door Magnus [5]), Bernard [6]) en Burgeff [7]). Daarbij is duidelijk aan het licht getre-

[1]) F. C. von Faber. Die Bakterien-Symbiose der Rubiaceen. Jahrb. f. wiss. Botanik. Bd. 54, 1914, pag. 243.

[2]) H. Miehe. Weitere Unters. über die Bakterien-Symbiose bei Ardisia crispa. Jahrb. f. wiss. Botanik. Bd. 53, 1914, pag. 1.

[3]) E. M. Freeman. The Seed-Fungus of Lolium temulentum. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Vol. 169 B, 1904, pag. 1.

[4]) E. Hannig. Uber pilzfreies Lolium temulentum. Bot. Zeitung. 65, 1907, pag. 25.

[5]) W. Magnus. Zie: L. Jost, Vorlesungen über Pflanzenphysiologie 3te Aufl. 1913, pag. 317.

[6]) N. Bernard. Remarques sur l'immunité chez les plantes. Bull. de l'Inst. Pasteur. Tome VII, 1909, pag. 369.

[7]) Burgeff. Die Wurzelpilze der Orchideen. Jena, 1909. Zie L. Jost, Vorlesungen üb. Pflanzenphysiologie, 3te Aufl., 1913, pag. 319.

den, dat de bewuste schimmels niet alleen in de wortels der Orchideeën van physiologische beteekenis zijn, maar dat ook voor het kiemen van orchideeënzaden de aanwezigheid van de specifieke schimmelsoorten onmisbaar is.

De daarbij waargenomen verschijnselen, d.w.z. het binnendringen van de schimmel in het embryo en de wijze, waarop de cellen van het embryo zich ten opzichte van het binnendringende mikro-organisme gedragen, zijn van groote beteekenis voor de verruiming van ons inzicht aangaande het wezen der symbiose.

Een en ander leidde BERNARD ertoe de volgende beschouwingen te ontwikkelen aangaande de mogelijkheden, welke zich voordoen bij het binnendringen van een mikro-organisme in een levend weefsel eener hoogere plant [1]).

Al naar gelang van den aard en den physiologischen toestand van het mikro-organisme eenerzijds en den aard en den physiologischen toestand van het plantenweefsel anderzijds, zullen nu verschillende gevallen zijn gerealiseerd.

In de eerste plaats is het mogelijk, dat het mikro-organisme zich krachtig vermeerdert ten koste van de bestanddeelen der aangetaste cellen. Onder zekere voorwaarden zal dit zelfs zoo ver gaan, dat de betreffende cellen afsterven, waarna in den regel ook de omringende cellen zullen worden aangegrepen. Dit heeft dus een meer of minder volledige verwoesting van het aangetaste weefsel en eventueel zelfs van geheele deelen der plant ten gevolge. Dit zal dan onvermijdelijk tot uiting komen in den geheelen toestand van de plant, welke dan afwijkingen van pathologischen aard zal vertoonen. Onder deze omstandigheden pleegt men het mikro-organisme als parasiet te kwalificeeren.

Dit geval is sinds de ontwikkeling der moderne phytopathologie geenszins zeldzaam gebleken te zijn en om deze reden laat SMITH zijn in § 1 aangehaalde uitspraak dan ook volgen door: „the case is quite different however, with wounded plants or wilted ones."

In de tweede plaats is echter door de onderzoekingen van HILTNER [2]) en BERNARD [3]) duidelijk aan het licht getreden, dat de cellen der hoogere planten geenszins ten allen tijde weerloos zijn

---

[1]) l.c. pag. 369. Zie ook: J. MAGROU. La symbiose chez les plantes. Bull. de l'Inst. Pasteur. Tome XX, 1922, pag. 169 en 217, en het werkje van M. CAULLERY, Le Parasitisme et la Symbiose. Paris, 1922.

[2]) L. HILTNER. Zie: LAFAR, Handb. d. Techn. Mykologie. Bd. III, 1904—1906, pag. 45.

[3]) l. c. pag. 369.

tegenover eventueel binnengedrongen mikroben. Onder zekere omstandigheden zal de mikrobe in de cel worden aangegrepen en waarschijnlijk somtijds geheel tot oplossing gebracht.

Tusschen deze twee gevallen in ligt nu evenwel een derde mogelijkheid, waarbij in een deel van het weefsel het mikro-organisme zich zeer wel kan ontwikkelen, zonder nochtans de cellen tot afsterven te brengen, terwijl het binnendringen in het overige deel van het weefsel wordt tegengegaan, doordat in de betreffende grenslagen een in-activeering of zelfs oplossing van het mikro-organisme plaats heeft. Het is dit compromis tusschen parasiet en voedsterplant, dat men als symbiose pleegt aan te duiden. Of, zooals BERNARD het kort typeert: „La symbiose est à la frontière de la maladie." Deze zienswijze brengt met zich mede het bestaan van allerlei denkbare overgangsvormen tusschen parasitisme en symbiose eenerzijds, en symbiose en volledige immuniteit van de voedsterplant ten opzichte van de mikroben anderzijds.

§ 3. *Het voorkomen van mikro-organismen in doode weefselelementen van hoogere planten.*

Bovenstaande beschouwingen gelden intusschen uiteraard alleen voor het binnendringen van mikro-organismen in nog levende plantenweefsels. Nochtans treft men in iedere hoogere plant ook afgestorven weefselelementen aan, die daarin evenwel nog zeer gewichtige physiologische functies hebben te vervullen. In het bijzonder geldt dit voor de houtvaten, waarvan de belangrijke rol als banen voor den opstijgenden sapstroom buiten twijfel is gesteld.

Hoewel deze doode elementen bij geheel onbeschadigde planten nergens aan de oppervlakte komen en deze dus nimmer primair geïnfecteerd kunnen worden, zal het toch in de natuur geenszins tot de uitzonderingen behooren, dat ook mikro-organismen in de genoemde elementen doordringen. Hiervoor is het niet noodzakelijk, dat het betreffende mikro-organisme eerst levende weefseldeelen heeft overwoekerd, immers kleine, in de natuur geenszins zeldzame verwondingen zullen ten gevolge hebben dat de houtvaten in directe aanraking komen met de, in de omgeving van de plant nimmer ontbrekende mikroben. Tengevolge van den sapstroom zullen in dat geval deze mikroben over belangrijke afstanden in de houtvaten worden vervoerd. De vraag rijst nu, wat het gevolg eener infectie van deze doode elementen zal zijn.

In de eerste plaats moet dan geconstateerd worden, dat een

actieve immuniteit in dit geval vanzelf sprekend buitengesloten is. Daarbij komt, dat de voorwaarden voor de instandhouding en ontwikkeling van binnengedrongen kiemen in velerlei opzicht niet ongunstig moeten worden geacht. Immers, in tegenstelling met hetgeen tot nog toe werd aangenomen, dat namelijk het houtgedeelte der vaatbundels uitsluitend zou dienen voor het transport van het water met de daarin opgeloste minerale bestanddeelen, is onlangs door Dixon [1]) en Ball uitermate waarschijnlijk gemaakt, dat ook het transport der in de plant gevormde organische verbindingen, althans voor een overwegend deel, door de houtvaten plaats heeft. Indien deze verbindingen geen geschikt voedsel voor de binnengedrongen mikroben vormen, zullen deze laatste zich niet kunnen ontwikkelen en vrij spoedig afsterven. In het tegengestelde geval vermeerderen zij zich in de houtvaten, waarbij dan de mogelijkheid bestaat, dat de mikrobengroei gepaard gaat met een aanmerkelijke vorming van wandstoffen, welke tot een verstopping dier vaten aanleiding zou kunnen geven. Indien dit verschijnsel een voldoenden omvang aanneemt, zal hiervan een belangrijke verstoring in den physiologischen toestand van de plant het gevolg zijn, zoodat men in dit geval ook het betrokken mikro-organisme, ofschoon dit slechts in doode weefselelementen voorkomt, als parasiet zal kenmerken.

Maar ook blijft het denkbaar, dat de ontwikkeling van het mikro-organisme niet zulke afmetingen aanneemt, dat hieruit voor de plant schadelijke gevolgen voortvloeien. In een dergelijk geval zal men dan toch in het inwendige van een uiterlijk geheel normale plant dikwijls een groot aantal kiemen kunnen aantreffen.

Men moet nu vaststellen, dat aan de mogelijkheid van het voorkomen van mikro-organismen uitsluitend in doode weefselelementen wel wat weinig aandacht wordt geschonken. Oudere onderzoekers, zooals Laurent [2]), kwamen tot de conclusie, dat ook in de houtvaten van normale planten geen mikro-organismen aanwezig zijn. Intusschen ontbreekt het niet geheel aan aanwijzingen, dat ook met het tegengestelde geval somtijds rekening wordt gehouden. Zoo treft men bij Smith in vervolg op zijn eerder in dit hoofdstuk

[1]) H. H. Dixon, Transport of Organic Substances in Plants. Nature. Vol. 110, 1922, pag. 547.

[2]) E. Laurant. Expériences sur l'absence de bactéries dans les vaisseaux des plantes. Bull. de l'Académie Royale des Sciences, des Lettres et Beaux-Arts de Belgique, 1890, 3me Série, T. 19, pag. 468.

geciteerde uitlatingen de opmerking aan: „The parenchyma of healthy plants is always or almost always free from bacteria. Probably the vascular system, especially of some parts of the roots frequently contains bacteria."

Door een recent onderzoek van GÄUMANN [1]) is intusschen de mogelijkheid gebleken van de aanwezigheid eener accidenteele mikroflora in de houtvaten van hoogere planten, welke aanwezigheid niet in ziekelijke afwijkingen van de betrokken plant tot uiting komt. GÄUMANN bracht steriel uitgesneden weefselstukjes van wilde bananenplanten op geschikte kultuurplaten. Zoowel uit de bladscheeden verkregen vaatbundels als parenchymatisch weefsel werden op deze wijze onderzocht. Zijn kultuurproeven leverden een negatief resultaat op, waaruit hij tot de slotsom kwam, dat in het algemeen de weefsels der wilde bananen vrij van mikro-organismen zijn [2]).

Voor de gecultiveerde bananen kwam hij evenwel tot een afwijkend resultaat. In het geheele vaatbundelstelsel van op het eerste gezicht normale planten werden door hem ten allen tijde mikroorganismen aangetroffen. Een nader onderzoek van het rhizoom en het verdere wortelstelsel leert in dergelijke gevallen dan weliswaar steeds gelocaliseerde, dikwijls vrij onbeteekenende verkleuringen in de laatstgenoemde plantendeelen kennen, maar GÄUMANN verwerpt toch de opvatting, dat men op grond hiervan alle op Java gecultiveerde bananen voor ziek zou moeten verklaren. Hij spreekt daarom in dergelijke gevallen van „relatief gezonde" planten en hiervoor geldt zijn hieronder volgende uitspraak:

„Bij slechts relatief gezonde bananen, waar dus zieke, verkleurde vaatbundels alleen in den wortelstok, maar niet in den schijnstam en de bladeren voorkomen, worden daarentegen door den sapstroom verschillende organismen, vooral bacteriën en Fusariumsporen, uit het zieke rhizoom naar boven gevoerd. Hier vermogen zij geen waarneembare werkingen uit te oefenen, zelfs dan niet, wanneer zij kunstmatig in groote hoeveelheden erin geënt worden. Waarschijnlijk gaan zij in den schijnstam spoedig dood." [3]) Hieruit leidt GÄUMANN af, „dat de in anders gezonde bananenplanten voorkomende rottingsbacteriën onder normale omstandigheden geen eigenlijke vaatbundelziekten veroorzaken." [4]) Ten overvloede wijst

[1]) E. GÄUMANN. Over een bacterieele vaatbundelziekte der bananen in Ned.-Indië. Mededeelingen v. h. Instituut voor Plantenziekten, No. 48, 1921.
[2]) l.c. pag. 28.
[3]) l.c. pag. 29.
[4]) l.c. pag. 31.

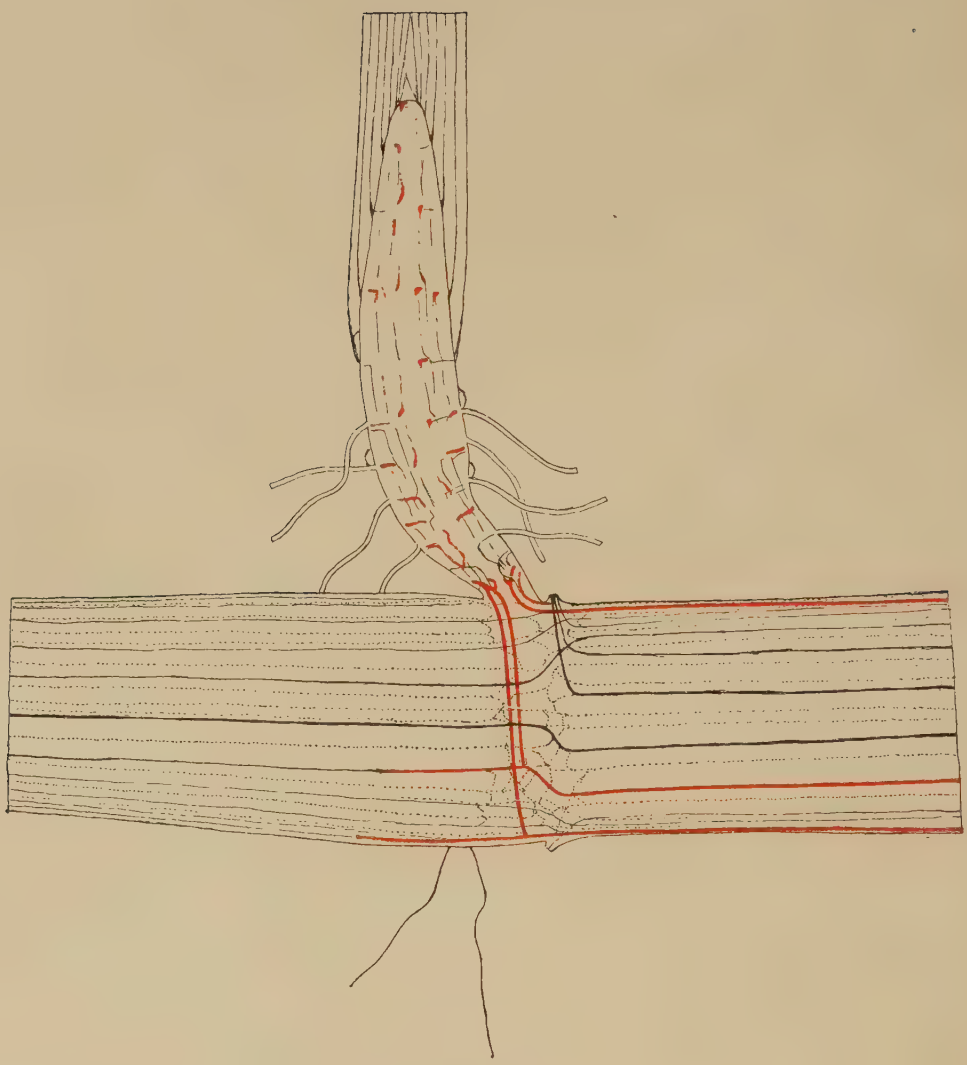

Fig. 1.

Schematische voorstelling van het verloop van het vaatbundelstelsel in bibit en jonge spruit. De figuur geeft den samenhang der vaatbundels weer bij een door serehziekte aangetaste bibit; de roode lijnen stellen de verkleurde vaatbundels voor.

hij erop, dat „overal waar in de weefsels van bananen voldoend diepe wonden worden aangebracht, bacteriën in de vaatbundels treden en, in zwakkere mate in den wortelstok, op grootere schaal in de bladscheeden, locale verkleuringen en ziekten veroorzaken. Deze bacteriën zijn echter niet werkelijk pathogeen en zijn ook niet in staat bijzondere massawerking uit te oefenen" [1]).

Reeds op grond van deze in 1922 gepubliceerde waarnemingen van Gäumann moet het a priori waarschijnlijk worden geacht, dat ook het vaatbundelstelsel van uiterlijk normaal suikerriet niet vrij van mikro-organismen zal zijn. Dit wordt vooral duidelijk, wanneer we bedenken, dat ook in de suikerrietkultuur de vegetatieve wijze van vermenigvuldiging wordt toegepast om den nieuwen aanplatn te verkrijgen. Immers daarbij vormt de rietstek of bibit gedurende het geheele leven van de rietplant een wonde plek, van waaruit door den sapstroom mikro-organismen in het vaatbundelstelsel kunnen worden opgevoerd. Overweegt men daarbij, dat tengevolge van het bibit-rotproces een sterke ophooping der bacteriën in de onmiddellijke omgeving van de boven gesignaleerde toegangspoort plaats grijpt, dan kan het moeilijk anders, of een deel dier mikro-organismen zal ook in het vaatbundelstelsel van den rietstengel terechtkomen, daar dit in verbinding staat met het vaatbundelstelsel van den bibitknoop, zooals in fig. I schematisch is weergegeven.

Zooals men zal zien, leveren de later te beschrijven proefnemingen een bevestiging van de boven uiteengezette zienswijze.

Hier ter plaatse zij nog slechts vermeld, dat tijdens mijn onderzoek een zeer belangrijke verhandeling over de gomziekte van het suikerriet verscheen van mej. Wilbrink [2]), waarin deze ook terloops melding maakt van het feit, dat volwassen stengeldeelen van het suikerriet zeer vaak saprophyten bevatten.

---

[1]) l. c. pag. 121.

[2]) G. Wilbrink. De gomziekte van het suikerriet, hare oorzaak en hare bestrijding. Archief voor de Suikerindustrie in Ned.-Indië, 1920, pag. 1425.

HOOFDSTUK II.

Overzicht van vroegere onderzoekingen betreffende de serehziekte.

Omtrent de aetiologie van de serehziekte van het suikerriet zijn sedert 1885 verschillende verhandelingen verschenen, waarin de meest uiteenloopende hypothesen werden opgesteld. Duidelijk zijn hierbij twee richtingen te onderscheiden, n. l. de ééne, waarbij de meening wordt geuit, dat de serehziekte niet van parasitaire natuur is, en de andere, waarbij men overtuigd is van den parasitairen aard der ziekte. Deze laatste zienswijze is verreweg in de meerderheid.

In 1885 opende TREUB [1]) de reeks van wetenschappelijke onderzoekingen met een verhandeling, waarin als vermoedelijke verwekker der sereh een nematode, Heterodera javanica, wordt aangegeven, een parasiet, die in de wortels woekert. Hiermede zou het epidemisch en besmettelijk karakter der serehziekte zijn verklaard. Verder vermeldt TREUB, dat een secundair optreden van een schimmel, een Pythiumsoort, zeer nadeelig is voor de aangetaste planten.

In 1889 vond SOLTWEDEL [2]) in de wortels van serehzieke planten eveneens een nematode, doch van een ander geslacht, n. l. Tylenchus sacchari. Evenals bij TREUB wordt door SOLTWEDEL de besmettelijkheid der serehziekte verklaard door het optreden van deze wortelparasiet.

Bijna in elk der volgende jaren, tot 1911 toe, verschenen een of meerdere publicaties, die op de oorzaak der serehziekte betrekking hadden. Dat daarbij ook volop aandacht werd geschonken aan de mogelijkheid, dat een mikro-organisme als verwekker der ziekte zou kunnen optreden, lag voor de hand. Immers sedert het begin van de tweede helft der negentiende eeuw was men erin geslaagd de oorzaak van talrijke plantenziekten op het binnendringen van schimmels terug te voeren.

Daarbij kwam nog, dat omstreeks 1880 de eerste gevallen van door bacteriën veroorzaakte plantenziekten bekend werden, dank zij de onderzoekingen van BURRILL, PRILLIEUX, WAKKER e.a. [3])

---

[1]) M. TREUB. Onderzoekingen over serehziek suikerriet. Mededeelingen uit 's Lands Plantentuin, II, 1885.

[2]) F. SOLTWEDEL. De serehziekte. Mededeelingen van het Proefstation Midden-Java. Semarang, 1889.

[3]) ERWIN F. SMITH. Bacteria in Relation to Plant Diseases. Dl. 2, 1911, pag. 7.

KRÜGER [1]) was de eerste onderzoeker, die in 1890 de desorganisatie der weefsels van serehzieke rietstengels aan de werking van bacteriën toeschreef. Meer dan een veronderstelling kan deze mededeeling niet geweest zijn, daar KRÜGER geen isolatieproeven der betrokken mikrobe vermeldt.

Een aanvang met het bacteriologisch onderzoek naar de oorzaak der serehziekte werd gemaakt door JANSE [2]) in 1891. Hij schrijft de serehziekte toe aan een door hem geïsoleerde bacterie, waaraan bij den naam geeft van Bac. sacchari, die dikwijls door Bac. glagae wordt vergezeld, beide sporevormers. De eerstgenoemde mikrobe wordt door hem echter ook aangetroffen in gezond suikerriet en vele andere planten, zoodat zij niet specifiek is voor het serehzieke riet.

Bij zijn onderzoek werden de knoopen der zieke stengels, na desinfectie met 0,1% sublimaat-oplossing, uitgesneden en 10 à 30 minuten gekookt in zuiver regenwater en daarna in steriele glazen schalen ondergebracht. Op de aldus behandelde stengeldeelen ontwikkelden zich dan na eenigen tijd de mikroben. Door het koken blijven alleen de sporevormers achter, zoodat het begrijpelijk is, dat JANSE uitsluitend op deze groep van mikroben stuit.

DEBRAY [3]) vermeldt, dat hij bij een herhaling van JANSE's proeven gelijke resultaten kreeg, wanneer de oppervlakte van het riet onvoldoend was gesteriliseerd. Er werden echter geen organismen door hem gevonden bij behoorlijke sterilisatie van het stengeloppervlak.

Op grond van hetgeen aan het slot van het vorige hoofdstuk werd opgemerkt, lijkt het intusschen geenszins uitgesloten, dat de door JANSE geïsoleerde sporevormers inderdaad uit het inwendige van den rietstengel afkomstig zijn.

Het onderzoek van VALETON [4]), eveneens in 1891 verschenen, kenmerkt zich door een uitgebreide anatomische studie van het serehzieke riet. Belangrijk hierin zijn de waarnemingen over het ontstaan der gom bij de kieming van serehzieke stekken.

Wat het bacteriologisch onderzoek betreft, treedt VALETON in

---

1) W. KRÜGER. Vorläufige Mitteilungen über die Serehkrankheit des Zuckerrohrs (Rotz, Bacteriosis). Berichte der Versuchsstation für Zuckerrohr in West-Java, Kagok-Tegal, Teil 1, 1890.

2) J. M. JANSE. Het voorkomen van bacteriën in suikerriet. Mededeelingen uit 's Lands Plantentuin IX, Batavia, Landsdrukkerij, 1891.

3) ERWIN F. SMITH. Bacteria in Relation to Plant Diseases. Dl. 3, 1914, pag. 76.

4) TH. VALETON. Bijdrage tot de kennis der serehziekte, 41 pag., 1 Taf. Proefstation Oost-Java, Batavia, Kolff & Co., 1891.

een herhaling van de proeven van JANSE, doch gaat blijkens zijn „Naschrift" belangrijk verder dan deze, door fragmentjes van het zieke knoopweefsel in kultuurvloeistoffen te brengen. Hoewel deze proeven tot geen gevolg geleid hebben, zijn ze reeds in beginsel juist. Het mislukken dezer proeven schijnt voor VALETON een reden te zijn geweest om de inrichting van de proef te wijzigen; hij neemt nu geen fragmentjes uit den knoop als infectiemateriaal, maar het perssap ervan, blijkens de zinsnede uit het „Naschrift": „Ondertusschen is het mij ook gelukt uit droppels uit serehziek riet uitgeperst sap, onder de noodige voorzorgen opgevangen, uiterst fijne tot kleine groepjes vereenigde staafjes te kweeken, die misschien zullen blijken met de door Dr. JANSE gevondene overeen te komen."

Reeds langen tijd waren mijn proeven steeds met onder aseptische voorwaarden opgevangen perssap uit serehziek riet uitgevoerd, toen ik van de werkwijze van VALETON kennis nam. Mijn kultuurproeven waren dus in beginsel een herhaling van die van VALETON. Zij verschilden hiervan, doordat na kultiveering het mengsel der aanwezige mikrobensoorten op gelatineplaatkulturen werd ontward.

De publicaties van BENECKE [1]), gedurende de jaren 1891 tot 1893 verschenen, zijn hoofdzakelijk besprekingen van het werk van KRÜGER, JANSE, VALETON en andere onderzoekers, doch leveren voor het opsporen van de sereh-oorzaak geen nieuwe gezichtspunten op.

De onderzoekingen van WENT [2]) over de serehziekte, in 1893, 1895 en 1896 gepubliceerd, werden in 1898 samengevat in het bekende werk van WAKKER en WENT: „De ziekten van het suikerriet op Java".

WENT achtte het destijds niet uitgesloten, dat de serehziekte zou samenhangen met het voorkomen van een schimmelsoort, Hypocrea sacchari, in de bladscheede van het serehzieke riet, waarnaast ook wortelziekten een rol zouden spelen. Zeer waarschijnlijk is WENT deze meening niet meer toegedaan. Het zwaartepunt van zijn beschouwingen dient gezocht te worden in de belangrijke, door hem ontwikkelde argumenten ten gunste van de opvatting, dat de serehziekte van infectieuzen aard zou zijn.

---

1) F. BENECKE. „Sereh", Onderzoekingen en beschouwingen over oorzaken en middelen. Mededeelingen v. h. Proefstation „Midden-Java" te Klaten, 1891 — 1893. Literatuuroverzicht in „Bacteria in Relation to Plant Diseases", Dl. 3, 1914, pag. 79 en 80.

2) J. H. WAKKER en F. A. F. C. WENT. De ziekten van het suikerriet op Java. Leiden, 1898.

In de eerste plaats wijst hij hiertoe op de langzame verbreiding der ziekte over Java van Oost naar West gedurende de jaren 1882 tot 1894. [1]) Een analyse van de beschikbare gegevens leerde, dat elk jaar een iets meer oostelijk gelegen streek werd aangetast en dat verder het eerste optreden der serehziekte hoogst sporadisch was, om in volgende jaren meer en meer toe te nemen.

Op deze geregelde verbreiding kwamen weliswaar uitzonderingen voor. Enkele ondernemingen werden eerder aangetast dan meer westelijk gelegen ondernemingen; een verklaring hiervoor was echter te vinden in het feit, dat in die gevallen buiten twijfel import van bibit uit aangetaste gebieden had plaats gehad. Een andere uitzondering was deze, dat streken, die door hooge bergketenen afgesloten waren, later aangetast werden dan volgens haar ligging verondersteld moest worden. Het totaal der gegevens betreffende de verbreiding was echter geheel in overeenstemming met de opvatting der sereh als infectieziekte.

Als nader bewijs hiervoor wijst WENT erop, dat gezonde stekken in streken, waar geen serehziekte voorkomt, gezond riet opleveren, terwijl diezelfde stekken, gebracht in streken, waar de ziekte heerscht, riet opleveren, dat allengs door sereh wordt aangetast.

Aan deze beschouwing voegt hij dan nog toe: „Het feit, dat serehzieke bibit weer serehzieke planten oplevert, kan voor de infectie-natuur der sereh spreken, maar behoeft dit niet te doen. Het zou toch mogelijk zijn, dat reeds de aanwezigheid van een aantal roodgekleurde, vergomde vaatbundels in de bibit ten gevolge had, dat die vergomming zich in de jonge plant voortzette, en dat hiermede gepaard dan ook als gevolg de uitwendige serehverschijnselen optraden." Als steun voor deze laatste mogelijkheid haalt WENT een waarneming van VALETON aan, door dezen als volgt beschreven:

„Een gezonde stek, den 15den Maart ter contrôle der proeven met serehzieke stekken in een kist uitgeplant, bracht drie planten voort. Een hiervan werd den 26sten Juni onderzocht en vertoonde geen spoor van roodkleuring, noch van gomvorming. De beide andere, nog aan de stek verbonden, werden in den vollen grond geplaatst. Deze vormden talrijke uitloopers, die de oude stoelen spoedig ver in groei overtroffen. Eenige dier uitloopers, den 28sten Augustus onderzocht, waren ook nu nog vrij van gom. Den 23sten October bleek een der oude stokken, die talrijke krachtige uitloo-

[1]) l. c. pag. 87.

pers gevormd had, door een stengelboorder te zijn aangetast, ook een der uitloopers was geheel uitgevreten; eenige der uitloopers aan die zijde waren nu bij de doorsnede licht rozerood op de knoopen, maar zonder nog gom in de vaten te bevatten. Den 3den December was deze hoofdstok gestorven en de onder de wond gelegen knoopen waren lichtrood en hadden veel donkerroode bundels zonder gom. Een der dikste zijstokken was nu typisch rozerood en in alle opzichten gelijk aan een serehzieken stok van ongeveer 3 maanden. De andere hoofdstam, die slechts twee uitloopers had, was evenals deze volkomen vrij van gom."

Hoewel het bovenstaande ziekteverloop nu inderdaad de mogelijkheid openlaat van een verklaring, die niet op de parasitaire natuur der serehziekte is gebaseerd, sluit het deze toch anderzijds in het geheel niet uit.

Het is dan ook begrijpelijk, dat WENT zich door deze onzekerheid niet laat weerhouden om op grond van de beide voorafgaande overwegingen te besluiten, dat aangezien de serehziekte een infectieziekte is, „de oorzaak der ziekte in hoofdzaak moet worden gezocht in parasieten."

Daarnaast is WENT zich echter zeer wel bewust, dat eveneens „zeker inwendige omstandigheden van de plant mede in aanmerking moeten worden genomen, daar immers verschillende rassen en zelfs verschillende individuën van éénzelfde ras zoo verschillende vatbaarheid voor de ziekte vertoonen."

Dit laatste gezichtspunt is één van de redenen, waarom, zooals WENT opmerkt, het bewijs, dat de ziekte contagieus is, dat dus een zieke plant een daarnaast staande gezonde plant kan infecteeren, zeer moeilijk is te leveren.

WENT kent dus onder de factoren, die het optreden der serehziekte beheerschen, behalve aan de parasiet, ook een ruime plaats toe aan de dispositie van de rietplant. Daarbij wijst hij er ook reeds op, dat deze dispositie in hooge mate afhankelijk is van tal van uitwendige omstandigheden, zooals klimaat, bodemtoestand, enz.

Indien we nu hiermede nog een stap verder gaan, rijst de vraag of we voor de verklaring der bij de serehziekte waargenomen verschijnselen niet alleen met den invloed der uitwendige factoren op de rietplant kunnen toekomen, en de veronderstelling van het bestaan eener, de serehziekte veroorzakende, parasiet geheel kan worden ontbeerd.

Het is bekend, dat in latere jaren vooral onder den invloed

van Sorauer [1]) in de phytopathologie een strooming is ontstaan, welke de beteekenis van de parasiet voor het tot stand komen van een parasitaire plantenziekte tot de kleinst mogelijke dimensies terugbrengt en daarentegen den factor van de „Prädisposition" van de plant zooveel mogelijk op den voorgrond stelt. Het lijdt geen twijfel, of deze nieuwe richting heeft zich bij de beschouwing van die ziektegevallen, waarvoor de onmisbaarheid van de aanwezigheid van de parasiet voor het tot stand komen der ziekte is vastgesteld, aan overdrijving schuldig gemaakt. [2])

Maar aan den anderen kant valt het niet te ontkennen, dat juist bij die ziekten, waar ieder direct bewijs voor het bestaan van een parasiet ontbreekt, niet spoedig genoeg de noodige aandacht kan worden geschonken aan den invloed van de uitwendige factoren op de ontwikkeling van de plant.

Zoo lijkt het gerechtvaardigd de vraag op te werpen, of althans de verschijnselen, waarop het tweede door Went aangevoerde argument ten gunste van den infectieuzen aard van de serehziekte berust, niet een even ongedwongen verklaring zouden kunnen vinden in de opvatting van de serehziekte als een door uitwendige factoren veroorzaakte, zoogenaamde physiologische ziekte.

Op dit standpunt staat blijkens zijn in 1897 verschenen publicatie ook Wakker. [3]) Deze onderzoeker neemt uitdrukkelijk geen organisme als verwekker van de serehziekte aan. Hij vat deze op als een gomziekte, ontstaan door watergebrek, dat gedurende het voortschrijden der ziekte tengevolge van de verstopping der vaten steeds toeneemt. Dit, gecombineerd met het feit, dat een primaire vergomming van de vaatbundels in de bibit eveneens het ontstaan van serehzieke planten kan veroorzaken, leidt hem tot de uitspraak, dat de serehziekte accumulatief en hereditair is

Het voortwoekeren van de serehziekte over Java van West naar Oost verklaart hij geheel door het aanwenden van aangetast plantmateriaal, uit West-Java afkomstig, waar de ziekte zich nu eenmaal zou hebben ingeburgerd.

Raciborski [4]) geeft, na vergeefsche pogingen te hebben gedaan

---

[1]) Men vergelijke bijv. : P. Sorauer. Handbuch der Pflanzenkrankheiten, 3te Auflage, 1909. Bd. I.

[2]) Vergel. : Joh^a. Westerdijk. De nieuwe wegen van het phytopathologisch onderzoek. Amsterdam, 1917, pag. 19.

[3]) J. H. Wakker. De sereh-ziekte. Mededeelingen van het Proefstation Oost-Java. Nieuwe serie, 1897, No. 35. Overgedrukt uit het Archief voor de suikerindustrie in Ned.-Indië, 1897.

[4]) M. Raciborski, Archief voor de Suikerindustrie in Ned.-Indië, VI, 1898, pag. 1021. „Over serehachtige ziekteverschijnselen",

ter opsporing van de parasiet, in 1898 als zijn meening te kennen. dat het optreden der serehziekte in de eerste plaats door uitwendige factoren, als klimaat, bodemtoestand, enz. wordt beheerscht. Hij laat echter ruimte voor de mogelijkheid, dat de ziekte daarom toch wel door een parasiet kan worden veroorzaakt.

Opmerkelijk zijn zijn proeven met verschillende looizuur-oplossingen, die, na door den rietstengel te zijn opgenomen, in verloop van eenige dagen de gezondste bergbibit de serehsymptomen bezorgen. Hieruit besluit hij terecht: „dat er, om sereh-achtige ziekteverschijnselen in een knoop van het riet te doen ontstaan, geen mikro-organisme noodig is, dat in dien knoop zelf zetelt."

In 1907 verscheen een verhandeling van VAN DER STOK, [1]) waarin hij de hypothese uitspreekt, dat de serehzieke rietplanten, tengevolge eener vegetatieve dubbelrasvariabiliteit, uit de normale planten ontstaan. Voor de verhouding, waarin de beide rassen gevormd worden, zijn de groeivoorwaarden van de grootste beteekenis, en wel zullen, evenals dit voor andere gevallen van tusschenrasvariabiliteit is geconstateerd, gunstige kultuurvoorwaarden het ontstaan van de abnormale variëteit bevorderen. Terwijl VAN DER STOK het parasitaire karakter van de serehziekte verwerpt, wordt door ZEIJLSTRA [2]) hiermede wel rekening gehouden in zijn in 1911 gepubliceerde proeve eener verklaring van de serehverschijnselen van het suikerriet, welke zich overigens nauw bij de hypothese van VAN DER STOK aansluit. ZEIJLSTRA werpt de mogelijkheid op, dat het suikerriet een dubbelras is van voor serehziekte immune en niet immune planten. Daarbij zou het dan nog van secundaire factoren afhangen, in hoeverre de planten van het niet-immune ras al of niet door de serehziekte werden aangetast. Terwijl de hypothese van VAN DER STOK wel een verklaring geeft voor het feit, dat eenzelfde rietsoort in het laagland, dus onder gunstige kultuurvoorwaarden in tegenstelling met wat in de hooggelegen bibittuinen het geval is, een belangrijk percentage aan serehzieke individuen oplevert, blijft zij in gebreke een verklaring te geven voor het feit, dat goede grondbewerking en bemesting in het laagland in het algemeen de vorming van serehzieke individuën merkbaar tegengaat. De door ZEIJLSTRA opgestelde hypothese geeft ook voor dit laatstgenoemde verschijnsel een verklaring. Op deze kwestie zal hier verder niet worden inge-

[1]) J. E. VAN DER STOK. Archief voor de Suikerindustrie in Ned.-Indië, 1907, pag. 581.

[2]) H. H. ZEIJLSTRA Fzn. Ber. der Deutsch. Bot. Geselsch. XXIX, 1911, pag. 330.

gaan, slechts moge worden geconstateerd, dat ook ZEIJLSTRA de meening is toegedaan, dat de parasitaire natuur van de serehziekte niet kan worden ontkend.

In 1916 wees QUANJER [1]) op de groote overeenkomst, die er zijns inziens bestaat tusschen serehziekte en phloëemnecrose en geeft als zijn meening, dat deze ziekte als pseudohereditair verschijnsel met de bladrolziekte der aardappels, veroorzaakt door een voorloopig nog hypothetisch virus, te vergelijken is.

Ten slotte mogen hier nog worden vermeld de proefnemingen van mej. WILBRINK [2]), welke beoogden het contagieuze karakter der serehziekte vast te stellen. Haar pogingen om aan te toonen, dat bij het snijden en kappen van gezond en serehziek plantenmateriaal met dezelfde werktuigen het eerste zou kunnen worden besmet, hadden geen resultaat. In verband met het feit, dat soortgelijke proeven bij gomziek riet wel leidden tot overbrenging der ziekte op het gezonde materiaal, zijn deze waarnemingen zeer zeker belangrijk. Bij herhaling dezer proeven kwam ik, zoowel voor het sereh- als voor het gomzieke riet, tot hetzelfde resultaat.

Het is niet te ontkennen, dat in de veronderstelling eener parasitaire natuur der serehziekte, de bovengenoemde verschijnselen moeilijk zijn te verklaren.

Het bovenstaande overzicht van de vroegere onderzoekingen aangaande de serehziekte kort samenvattend, kan gezegd worden, dat geen van de hierbij opgestelde hypothesen veel licht hebben gebracht over het wezen dezer ziekte.

De conclusie kan niet anders luiden, dan dat de meeste der onderzoekers de opvatting der serehziekte als zijnde van parasitaire natuur in meerdere of mindere mate zijn toegedaan, zonder dat zij hiervoor nochtans afdoende bewijzen hebben kunnen aanvoeren.

---

1) H. M. QUANJER. Aard, verspreidingswijze en bestrijding van phloëemnecrose (bladrol) en verwante ziekten, o.a. sereh. Mededeelingen van de Rijks Hoogere Land-, Tuin- en Boschbouwschool Dl. X, 1916, pag. 77.

2) G. WILBRINK. De gomziekte van het suikerriet, hare oorzaak en hare bestrijding. Archief voor de Suikerindustrie in Ned.-Indie, 1920, pag. 1524.

HOOFDSTUK III.

De toepassing van de gelatinekweekmethode in de tropen.

§ I. *De noodzakelijkheid van het gebruik van gelatine naast agar-agar.*

Toen voorloopige proeven mij geleerd hadden, dat zoowel in het normale als in het serehzieke suikerriet verschillende mikroorganismen naast elkander voorkwamen, sprak het vanzelf, dat ik gebruik wenschte te maken van de methode der vaste voedingsbodems voor de isoleering der afzonderlijke soorten, alsmede voor haar diagnosen. Zooals bekend, worden hiervoor gewoonlijk naast elkaar gelatine- en agar-agarsols gebruikt, die men in gesloten glasdoozen tot plaatvormige gels laat stollen. Hierop brengt men dan de te onderzoeken mikroben, hetzij met behulp van de uitzaaimethode, hetzij met behulp van de z. g. uitstrijkmethode [1]).

Aan het gebruik van gelatineplaten in de tropen is echter het bezwaar verbonden, dat deze reeds bij een temperatuur van 22 tot 25° C. vloeibaar beginnen te worden. Dit heeft ten gevolge gehad, dat de meeste onderzoekers, die in de tropen werkzaam waren, van het gebruik van gelatineplaten geheel hebben afgezien en zich tot het onderzoek op agar hebben bepaald. Dit nu moet als een ernstig bezwaar worden beschouwd. Immers de uiteenloopende chemische natuur van de beide gels — gelatine een eiwit, agar-agar een koolhydraat — heeft ten gevolge, dat op de gelatine eigenschappen aan het licht komen, die op agar verborgen blijven. Het duidelijkst blijkt dit uit het feit, dat de peptoniseerende en tryptische enzymen zich onmiddellijk kenbaar maken door de vervloeïing der gelatine, terwijl zij op agarplaten onopgemerkt blijven. Daarenboven vormen mikroben op gelatineplaten dikwijls karakteristieke koloniën, die opvallen door haar vorm en structuur, iets, wat op agarplaten in veel mindere mate het geval is.

Aan de andere zijde evenwel is het vervloeien van de gelatineplaten onder invloed van de bovengenoemde enzymen in vele gevallen een bezwaar bij het onderzoek naar de andere eigenschappen der mikroben, zoodat men dan op agar is aangewezen. Vanzelf

---

[1]) Deze laatste methode vindt men merkwaardigerwijze in de literatuur weinig beschreven. Voor een nadere beschrijving van het ten grondslag liggende principe zie men: C. H. Dopter en E. Sacquépée. Précis de Bactériologie, 1921, pag. 168.

sprekend is dit ook het geval, wanneer men de kultuurproeven bij een hoogere temperatuur dan 22° C. wil laten verloopen.

De beide gels vullen elkaar in het gebruik dus aan, zoodat voor een volledig onderzoek geen van beide zal mogen worden gemist.

§ 2. *De bruikbaarheid van de gelatinekweekmethode in de tropen.*

Om deze reden was het wenschelijk na te gaan, of werkelijk de bezwaren aan het gebruik van gelatine-kulturen bij tropentemperatuur (omstreeks 30° C.) onoverkomelijk waren.

Het onderzoek heeft het tegendeel bewezen; wanneer men slechts enkele kleine voorzorgen in acht neemt, zijn de plaatkulturen, die bij 20° C. worden gehouden, geruimen tijd op de arbeidstafel te onderzoeken, zonder dat vervloeïing der gelatine plaats heeft. In het koelere gedeelte van het jaar bleek een plaat van 12% gelatine eerst na 4 uren een begin van vervloeïing te vertoonen, terwijl in het heetere jaargetijde het smelten der gelatine eerst na 1 uur optrad. Dezen tijdsduur kan men verlengen door het percentage aan gelatine tot 15% te verhoogen. Deze hoogere concentratie bleek geen invloed van beteekenis te hebben op het uiterlijk der koloniën in vergelijking met dat op de gebruikelijke 12% gelatineplaten.

Bij het gebruik van gelatine-voedingsbodems moet men er evenwel rekening mede gehouden, dat het stolpunt van de gelatinesol door langdurige sterilisatie wordt verlaagd. Men zal er dus op uit zijn het steriliseeren zoo kort mogelijk te laten duren en dit bij zoo laag mogelijke temperatuur te laten plaats hebben. Hoever men hiermede gaan kan, hangt echter af van de bacterieele verontreiniging der voedingsstoffen, die aan de gelatine worden toegevoegd. Indien daarin sporevormers aanwezig zijn, is het moeilijk met de bovengenoemde eischen rekening te houden. Om deze reden is het aanbevelenswaardig, om, vooral in de tropen, de gelatineoplossing en de betreffende voedingsvloeistof afzonderlijk te steriliseeren en eerst vóór het gebruik te mengen. Daardoor kan de eerste steeds bij relatief lage temperatuur worden gesteriliseerd, waardoor ongewenschte verlaging van het stolpunt wordt voorkomen. Bovendien pleegt de gelatine onder deze omstandigheden steeds glashelder te blijven, wat niet het geval is, wanneer de gelatine wordt gesteriliseerd na te voren in de kultuurvloeistof te zijn gebracht. Het is echter duidelijk, dat bij de aangegeven werkwijze, waarbij de waterige gelatine-oplossing van dubbele concentratie met een gelijk

volume van de kultuurvloeistof wordt vermengd, ook deze laatste de dubbele concentratie van de gewenschte voedingsstoffen moet bevatten. In dit verband moet opgemerkt worden, dat tegen het steriliseeren van geconcentreerde voedingsoplossingen weleens bezwaren zijn aangevoerd.

Bij de toepassing van de gistingsproef van EIJKMAN bij het wateronderzoek gaat men uit van een geconcentreerde alkalische glucose-pepton-oplossing (10% glucose, 10% pepton en 5% keukenzout). DE WAAL [1]) vestigt er nog eens de aandacht op, dat reeds EIJKMAN zelf ondervond, dat deze geconcentreerde oplossing bij overmatige steriliseering de neiging heeft hare oorspronkelijke alkalische reactie te veranderen in een zure, waardoor de groei van tal van organismen onmogelijk wordt gemaakt.

Gedachtig hieraan, werd door mij speciaal nagegaan, of eenzelfde geval zich ook bij de door mij gebruikte kultuurvloeistoffen voordeed.

De voornaamste door mij gebruikte voedingsvloeistoffen waren een glucose-pepton-oplossing met 2% glucose en 0,5% pepton en verder een moutextract met 8% moutsuiker, 0,15% asparagine en 0,05% K_2HPO_4. Om een vasten voedingsbodem van deze samenstelling te maken, was het dus noodig een waterige oplossing van het dubbele der genoemde concentraties te steriliseeren en na afloop daarvan te vermengen met een gelijk volume van een 30% waterige gelatine-oplossing.

Het bleek mij, dat op de aldus samengestelde voedingsbodems zeer verschillende organismen zich uitmuntend ontwikkelden.

Wat verder de uitvoering van de gelatine-kweekmethode aangaat, moge nog het volgende worden opgemerkt. Voor het gieten van een plaat worden de beide kolfjes respectievelijk met geconcentreerde voedingsvloeistof en met de gesmolten waterige gelatine-oplossing bij elkaar gevoegd, goed gemengd, tot dicht bij het stolpunt afgekoeld en in een glasdoos uitgegoten, alles onder de noodige voorzorgen ter handhaving van de steriliteit. De kultuurdoos wordt dan bij 20° C. geplaatst en is na een uur voor gebruik gereed.

Om de beschikking te krijgen over een ruimte van omstreeks 20° C. in het tropische laboratorium, waar de temperatuur in den regel omstreeks 30° C. bedraagt, kan men met succes van een eenvoudige ijskast gebruik maken. Na eenige proefnemingen slaagde ik er spoedig in door regeling van de hoeveelheid ijs de temperatuur

[1]) J. W. DE WAAL. Het water in de Neder-Betuwe. Bacteriologische en scheikundige onderzoekingen. Dissertatie 1918, pag. 51.

in de kast rondom 20° C. te houden. De koeltrog werd tweemaal daags, in den voormiddag en tegen den avond, van ijs voorzien. Het bleek mij, dat de temperatuur tusschen 18° en 23° C. schommelde.

Voor het maken van plaatkulturen, waarbij stoffen als krijt en loodcarbonaat zooveel mogelijk homogeen in de gelatine gesuspendeerd moeten blijven, neemt men de voorzorg de te gebruiken nog ledige glasdoozen te voren geruimen tijd bij 20° C. te plaatsen. Het kolfje met de suspensie in de gesmolten gelatine wordt dan onder voortdurend omschudden in het ijswater van den koeltrog afgekoeld. Juist vóór de inhoud van het kolfje stolt, giet men dezen in de afgekoelde kultuurdoos uit, zoodat hij daarin onmiddellijk vast wordt.

Het werken met gelatine volgens de aangegeven methode heeft zeer bevredigende resultaten opgeleverd. Het onderzoek der gelatinekulturen op de werktafel bleek zelden meer dan een half uur te vereischen, terwijl vervloeiing eerst na één uur of aanmerkelijk later intrad.

Vermeld moge nog worden, dat het gebruik van speciale gelatine met hoog smeltpunt, z.g. tropengelatine [1]), niet aan de verwachtingen beantwoordde. Het bleek mij niet mogelijk deze gelatine-oplossingen te steriliseeren, zonder wederom het stolpunt terug te brengen tot dat der met gewone gelatine bereide oplossing.

HOOFDSTUK IV.

De gevolgde methodiek voor het onderzoek naar mikroben in het suikerriet.

§ 1. *Algemeen overzicht der gevolgde methode.*

Teneinde het inwendige van het suikerriet op de aanwezigheid van mikro-organismen te onderzoeken, werd als volgt te werk gegaan.

In de eerste plaats werd op de hieronder nader te beschrijven wijze een cylindertje uit het merg van den stengel onder aseptische voorwaarden geïsoleerd. Vervolgens werd dit cylindertje of een deel hiervan op zoodanige wijze uitgeperst, dat infecties van buitenaf uitgesloten waren. Ten slotte werd het in steriel vaatwerk opgevangen perssap volgens de gebruikelijke methoden op de aanwezigheid van kiemen onderzocht.

Op deze wijze werden nagenoeg zonder uitzondering minstens

---

[1]) Tropengelatine „Non plus ultra" van Gehe & Co., Dresden.

een drietal leden van iederen stengel onderzocht. Daartoe werden van ieder binnengekomen stengel steeds in de eerste plaats aan beide einden stukken ter lengte van twee of drie leden met een steriel mes afgekapt, nadat tevoren de door te snijden plaatsen door flambeeren uitwendig kiemvrij waren gemaakt. Uitsluitend de meer naar binnen gelegen leden werden dus voor het onderzoek gebruikt.

Van de bij het onderzoek aangetroffen mikroben in den stengel mag dus worden aangenomen, dat zij hierin van den aanvang van het onderzoek af aanwezig waren.

In die gevallen, waarin het onderzoek tot drie leden van iederen stengel beperkt bleef, werden steeds twee dezer leden dicht bij de versche uiteinden van den stengel uitgekozen, terwijl het derde lid zooveel mogelijk uit het midden van den stok werd genomen. De détails van de gevolgde werkwijze zijn in de volgende paragrafen beschreven.

§ 2. *Aseptische werkwijze voor het uitsteken van een monster uit het inwendige van den rietstengel.*

Het onderzoek naar de in de rietstengels aanwezige mikro-flora geschiedde door deze stengels uit te persen en het vrijkomende sap op te vangen, alles onder zoodanige voorzorgen, dat geen infectie van buitenaf kon plaats grijpen.

Om dit mogelijk te maken, was het dus in de eerste plaats gewenscht, uit het inwendige van den stengel een gedeelte onder aseptische voorzorgen te isoleeren, waardoor storingen tengevolge van kiemen, welke op de oppervlakte van den stengel steeds aanwezig zijn, worden ontgaan. Weliswaar zou men ook kunnen trachten een uitwendige desinfectie van de stengeloppervlakte met behulp van antiseptica te bewerkstelligen. Hiervan werd intusschen afgezien, in de eerste plaats, omdat dit voor onderzoekingen op groote schaal te omslachtig en te tijdroovend is. Maar ook heeft de antiseptische methode het bezwaar, dat men niet met zekerheid kan beoordeelen, in welke mate de toegepaste desinfectiemiddelen in het plantenweefsel zijn doorgedrongen, waardoor het gevaar ontstaat, dat ook de gezochte mikroben worden gedood of althans verzwakt.

Om op aseptische wijze een monstertje uit den te onderzoeken rietstengel te verkrijgen, werd als volgt te werk gegaan.

De rietstok wordt op eenige centimeters van een knoop geflambeerd, met een steriel mes dwars doorgesneden en goed vlak afge-

Fig. 2.

Uitgeboorde stukken rietstengel, welke achterblijven bij de aseptische monsterneming.

Fig. 3.

Open pers.

sneden. Dit einde wordt nu gedrukt tegen een stuk plaatijzer, dat op een drievoet is geplaatst en met behulp van een grooten bunsenbrander op roodgloeihitte (pl. m. 500° C.) is gebracht. Met verschuift den rietstengel en draait dezen daarbij om zijn lengte-as onder stevig aandrukken tegen de gloeiende plaat, totdat het verhitte vlak geheel verkoold is. Door het steriele, zwart verschroeide oppervlak van het stengeleinde wordt een messing kurkboor gedrukt, die kort te voren is geflambeerd en afgekoeld, ofschoon dit laatste niet strikt noodzakelijk is. Men drukt de boor door den stengelknoop heen en draait dan krachtig een halven slag terug. Vooral bij eenige herhaling breekt het uitgestoken rietcylindertje bij den knoop af en wordt met de boor mee teruggetrokken. In het geval, dat deze werkwijze mislukt, kan men gemakkelijk het rietcylindertje inwendig afbreken door de boor krachtig zijdelings uit de as van den stengel te drukken en haar daarna terug te trekken. Aldus behandelde stukken rietstengel zijn in fig. 2 afgebeeld. Met een steriel ijzeren of glazen staafje drukt men het rietcylindertje uit de boor en brengt dit — na het nog even uitwendig geflambeerd te hebben — met een steriele pincet in een kort te voren gesteriliseerde pers.

§ 3. *De sapmonsterneming met behulp van de open pers.*

Na vele pogingen gelukte het mij een pers te construeeren, die geschikt was om op eenvoudige wijze afdoend te worden gesteriliseerd en zich voor snelle monsterneming leende.

Zij bestaat, zooals in fig. 3 is afgebeeld, uit een eenvoudige bankschroef, waarvan de bek voorzien is van twee vierkante persvlakken, zoodanig bevestigd, dat een paar der hoekpunten naar omlaag gericht zijn, wanneer de bankschroef omgekeerd aan de werktafel wordt bevestigd. Wordt een stukje riet nu hierin uitgeperst, dan vloeit het vrijkomende sap naar beneden bij de punt en kan aldaar in een reageerbuis worden opgevangen. Het kwam bij het onderzoek dikwijls voor, dat kleine stengeltjes moesten worden uitgeperst, die slechts enkele druppels sap gaven. Met het oog hierop was het raadzaam de persvlakken niet te groot te nemen, daar anders hieraan te veel sap blijft hangen en er geen druppel afvloeit. Daarenboven zijn kleine persvlakken handiger in het gebruik, omdat ze gemakkelijker en spoediger zijn te reinigen en te steriliseeren.

Men perst zoo krachtig en zoo snel mogelijk en vangt het sap op in een steriele reageerbuis, die bijna horizontaal wordt gehouden,

om het invallen van kiemen uit de omgeving te ontgaan. Daarna wordt de opening van de reageerbuis geflambeerd en met een wattenprop afgesloten. Door snel te persen ontbreekt het de afvloeiende sapdruppels aan tijd om zich aan de eventueel nog heete persvlakken belangrijk te verwarmen.

Door een passende keuze uit de serie van kurkboren kan men ook zeer goed kleine stengeldeelen aan geheel dezelfde bewerking als grootere onderwerpen. Het komt er bij de beschreven monsterneming vooral op aan om alle manipulaties in den kortst mogelijken tijd achter elkander uit te voeren.

§ 4. *De sapmonsterneming met behulp van de gesloten pers.*

Bij de boven beschreven werkwijze blijft intusschen nog steeds een zekere infectiekans bestaan, hoewel de practijk heeft geleerd, dat deze zeer gering is. De kans van infectie in de pers trachtte ik nu nog te verminderen door gebruik te maken van een geheel gesloten perslichaam.

De volgens dit beginsel geconstrueerde pers is in fig. 4 en 5 afgebeeld. Deze pers bestaat uit een persstempel, nauw omsloten door een cylindrischen mantel en die met behulp van een handwiel in verticale richting op en neer bewogen kan worden.

Onder den stempel is op een frame een gemakkelijk uitneembare en stevige stalen perskom van eenige centimeters diepte aangebracht, waarin de stempel nauwkeurig past. Het perssap kan door een opening in den bodem van het bakje langs een hellend afvoerbuisje afvloeien en opgevangen worden. Op zij is boven aan den opstaanden wand een opening aangebracht, waardoor het uitgestoken rietcylindertje in de pers geschoven wordt. Deze opening en evenzoo de ruimte tusschen stempel en onderliggend bakje, is door een nauw passenden bronzen mantel af te sluiten. Met een klein handvat is de mantel gemakkelijk draaibaar om de lengte-as, zoodat de opening van de perskom, die bedekt wordt door een overhangende lip van den mantel, vrij te maken is. Door den mantel geheel omhoog te schuiven, kan de perskom uitgelicht worden en is de stempel geheel toegankelijk, hetgeen voor het reinigen en steriliseeren dier beide onderdeelen noodzakelijk is. De pers is stevig op een zwaar houten onderstel bevestigd, dat eenigszins helt, om het afvloeien van het sap te bevorderen, hetgeen vooral van belang is, als de hoeveelheid gering is. Het houten bovenblad, waarop de pers is vastgeschroefd, is aan den voorkant met een scharnierinrichting

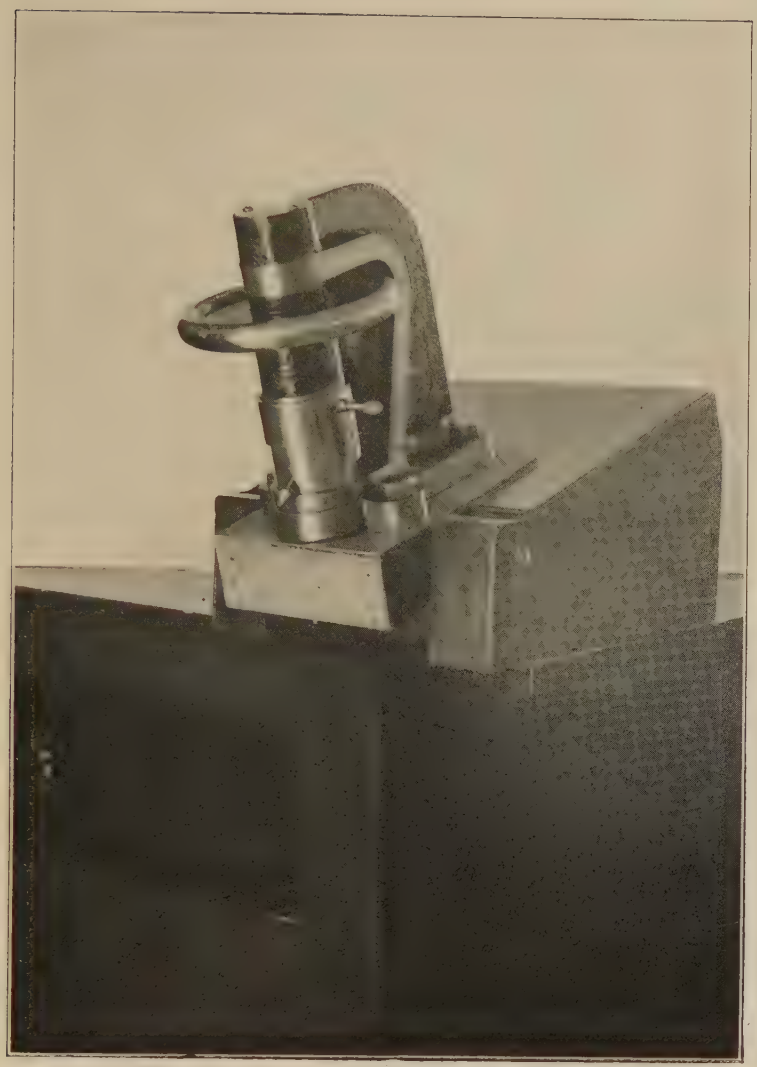

Fig. 4.

Gesloten pers.

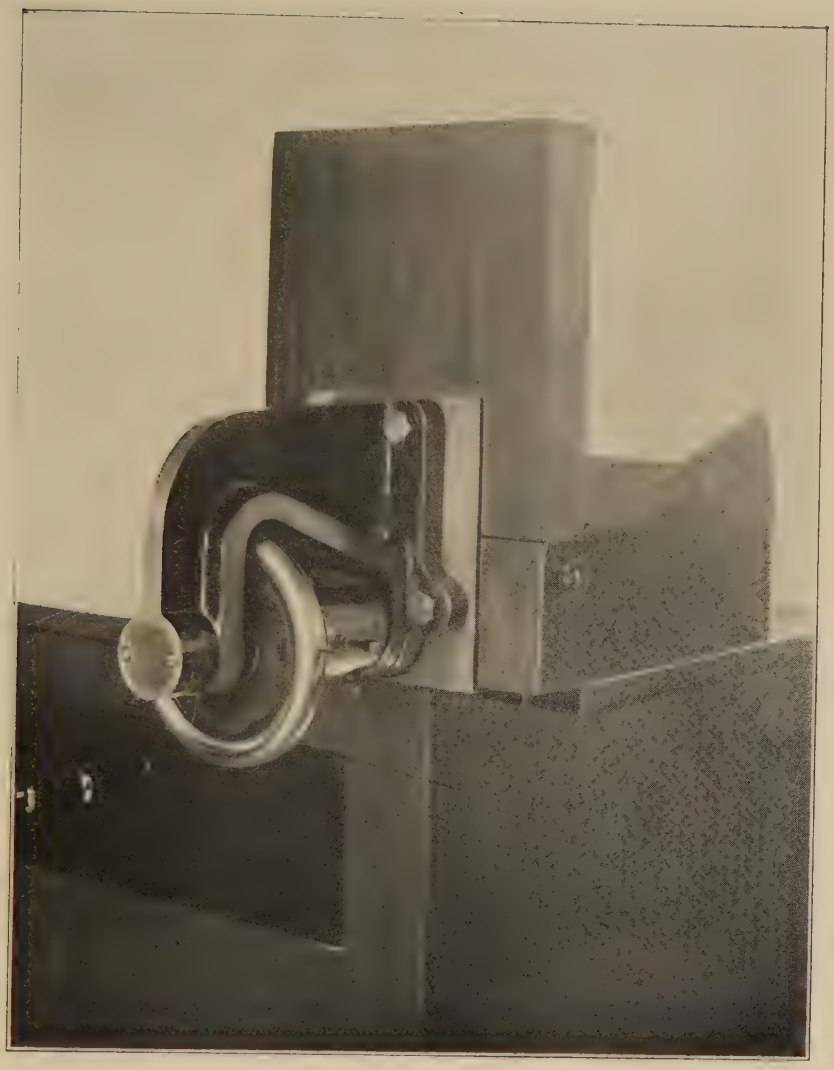

Fig. 5.

Gesloten pers.
Omgelegd.

zoodanig verbonden met het aan de werktafel bevestigde onderste gedeelte van het houten frame, dat met een enkele handbeweging de pers kan worden omgelegd en haar lengte-as daardoor horizontaal kan worden gesteld. Dit omleggen van de pers is noodig om bij het steriliseeren van den stempel door middel van flambeeren verwarming van het handwiel te voorkomen. Bij een verticalen stand van de pers zou bij het verhitten van den stempel de vlam het handwiel onmiddellijk verwarmen, waardoor dit spoedig een voor de hand ondraaglijke temperatuur zou aannemen. Om het houten bovenblad bij het flambeeren van het tuitje der perskom tegen overmatige hitte te beschermen, is aan den voorkant en onder het persframe een bekleeding van eterniet aangebracht.

Het steriliseeren van de pers geschiedt op de volgende wijze. De stempel wordt met behulp van het handwiel zoo hoog mogelijk opgeschroefd. De bronzen mantel wordt geheel naar boven geschoven en de perskom uit het frame gelicht en met alcohol van 96 vol.%, daarna met gedistilleerd water en ten slotte met een stukje watten, gedrenkt met een waterstof-superoxyde-oplossing van 5 — 10 % inwendig goed schoongemaakt. Om de perskom terdege te kunnen flambeeren, wordt ze in een porceleinen schaaltje met vlakken bodem op haar zijde gelegd met de invoeropening voor het rietcylindertje naar boven gekeerd en het afvoerbuisje met tuitje horizontaal liggend. Met een flinke bunsenvlam verhit men nu krachtig de inwendige ruimte der perskom en de invoeropening. Bij het reinigen met bovengenoemde vloeistoffen blijft in het afvoerbuisje ten slotte wat vloeistof achter, die capillair wordt vastgehouden. Verhit men krachtig het tuitje van buiten, dan zal de vloeistof gaan koken en verdampen, zoodat het geheele afvoerbuisje met stroomenden waterdamp wordt gesteriliseerd.

Nadat inwendig goed verhit is, laat men de vlam ook langs den geheelen buitenomtrek van de perskom spelen. Hierbij wordt met behulp van een buizentang de perskom meerdere malen omgewenteld, totdat alles flink verhit is. Ook de bronzen mantel wordt van zijn plaats gehaald en krachtig verhit. Om den persstempel te steriliseeren, wordt de pers omgelegd, met het handwiel de stempel geheel naar buiten bewogen en deze over den geheelen omtrek krachtig verhit. Vlug wordt daarna de stempel weer geheel naar binnen bewogen, de pers overeind gezet, de bronzen mantel en de perskom worden met behulp van een tang op hun plaats gebracht en ten slotte wordt de invoeropening met de lip van den mantel

afgesloten. Acht men dit laatste nog onvoldoende, dan kan men de afsluiting met een wattenprop verrichten, die juist te voren is gesteriliseerd. Behalve met den mantel is de perskom van boven met den stempel af te sluiten, dien men desnoods geheel naar beneden tot op den bodem der perskom kan bewegen. Voor het inbrengen van het uitgestoken rietcylindertje schuift men den mantel terzijde, flambeert nog eens de invoeropening, schroeft den stempel snel zoo hoog op, dat deze opening juist vrijkomt, brengt hierdoor het rietcylindertje vlug in de perskom en sluit met den mantel de opening weer af. Nu wordt het tuitje nogmaals uitwendig goed geflambeerd, daarna een steriele reageerbuis eronder gebracht en de pers krachtig aangezet, zoodat het sap in de reageerbuis spuit en derhalve weinig of geen tijd heeft gehad om zich noemenswaard aan de nog heete metaaldeelen der pers te verwarmen.

Voor een gemakkelijken gang van de pers kan men de schroef met een weinig vaseline of beter nog met grafiet inwrijven.

§ 5. *Contrôle op de doeltreffendheid van de maatregelen ter voorkoming van infectiën.*

Het spreekt vanzelf, dat het werken met de eerst beschreven open pers veel handiger is dan met de gesloten.

Of nu werkelijk met behulp van de beschreven persen het opvangen van sap zonder infectie van buitenaf kon geschieden, werd als volgt gecontroleerd.

Een zestal gezonde, dunne rietstengels, bestaande uit één lid met één knoop, werden in wijde reageerbuizen gedaan, met een watten prop gesloten en gedurende 1 uur bij een overdruk van 1 atmosfeer (120° C.) gesteriliseerd. Met een steriele kurkboor werd nu uit ieder der rietstengeltjes een cylindertje uitgestoken.

Om nu vast te stellen, in hoeverre deze bewerking zonder infectie had plaats gevonden, werd ieder der cylindertjes in een met steriel moutextract gevulde reageerbuis gebracht. Deze werden schuin opgesteld en bij 30° C. aan zichzelf overgelaten. Vervolgens werd dan nagegaan, in hoeverre in den loop van den tijd mikrobenontwikkeling in de buisjes plaats vond.

Alvorens ik echter deze proef verrichtte, kwam het mij gewenscht voor, mij nog door afzonderlijke contrôleproeven te overtuigen, dat het moutextract en in het algemeen alle bij de verdere proefnemingen door mij gebruikte kultuurvloeistoffen inderdaad

steriel waren en dit ook op den duur bleven, zoolang geen opzettelijke infectie werd teweeggebracht. Men zal geneigd zijn, dezen laatsten eisch als vanzelf sprekend te aanvaarden, maar in het vochtige tropische klimaat mogen extra voorzorgen in deze richting geenszins overbodig worden geacht. Bij herhaling toch constateerde ik, dat schimmeldraden langs de wattenprop van een met kultuurvloeistof gevulde reageerbuis van buiten naar binnen voortwoekerden, en ten slotte de kultuurvloeistof bereikten. Bij een speciaal tot dit doel ingezette proefneming, waarbij zes steriele buisjes met moutextract, schuin opgesteld, bij 30° C. aan zichzelf werden overgelaten, kon ik intusschen vaststellen, dat alle buisjes na 14 dagen nog steriel waren. Den 29sten dag werd op den binnen-glaswand van één der buizen echter het stralig vertakte mycelium van een schimmel waargenomen, dat eenigen tijd later ook de kultuurvloeistof infecteerde. De overige buisjes waren echter ook na 44 dagen nog steriel. In den regel zullen echter buizen, die twee maanden of langer bewaard worden, groot gevaar van infectie van buitenaf loopen.

De met moutextract gevulde reageerbuizen, waarin op de bovenbeschreven wijze een steriel rietcylindertje was gebracht, bleken na 14 dagen nog geheel steriel te zijn. Eerst na ruim een maand trad evenwel in enkele der buizen weer een schimmel-infectie op, welke echter langs de wattenprop in de buis bleek te zijn gekomen. We mogen dan ook besluiten, dat het uitsteken van cylindertjes uit het inwendige der rietstengels bij deze proeven en als regel ook bij alle verdere proefnemingen heeft plaats gehad, zonder dat infectie van buitenaf intrad.

Als tweede punt moest nu worden nagegaan, in hoeverre ook het uitpersen van de op bovenbeschreven wijze verkregen rietcylindertjes kon worden verricht, zonder dat het daarbij verkregen perssap van buitenaf was geïnfecteerd.

Allereerst werd dit gecontroleerd voor het persen met de *open* pers. Daartoe werden wederom zes cylindertjes uit gesteriliseerd suikerriet gestoken, vervolgens uitgeperst en het sap in buisjes met steriel moutextract opgevangen. Zelfs na een maand had in deze proefbuisjes geen ontwikkeling van mikro-organismen plaats. Wel had zich een geringe hoeveelheid vlokkig praecipitaat in de buisjes afgescheiden, maar zooals door uitstrijking op een geschikten voedingsbodem werd vastgesteld, had dit bezinksel niets met mikrobenontwikkeling uit te staan.

Om na te gaan, in hoeverre de afsluiting van de *gesloten* pers

geheel aan de eischen voldeed, werd een proef genomen, waarbij achtereenvolgens drie cylindertjes uit gesteriliseerde rietstengels werden uitgeperst, terwijl de pers slechts bij het begin der proefneming werd gesteriliseerd. Het sap der drie cylindertjes werd weer in buizen met steriel moutextract opgevangen. Het resultaat was, dat zich in het eerste buisje na 3 dagen een kultuur van Bac. mesentericus ontwikkelde, terwijl de beide andere buizen na 43 dagen nog steriel waren. Hieruit volgt dus wel, dat de in het eerste geval waargenomen infectie buiten de pers had plaats gevonden, zoodat de pers in alle opzichten kiemdicht bleek te zijn. Verder werden nog reeksen proeven genomen, waarbij op de gebruikelijke wijze werd te werk gegaan, dus de pers telkenmale na het behandelen van een monstertje opnieuw werd gesteriliseerd. In het geheel werden 23 monstertjes steriel riet uitgeperst, waarna telkens het daarbij verkregen sap op de beschreven wijze op steriliteit werd onderzocht. Hierbij bleken 7 buisjes te zijn geïnfecteerd, terwijl de 16 overige ook na gemiddeld een maand nog steriel waren.

Van belang is op te merken, dat in alle gevallen waarin infectie optrad, deze door sporevormers werd veroorzaakt. Aangetroffen werden Bac. mesentericus (3 maal), Bac. megatherium (1 maal), en een niet nader gedetermineerde sporevormer (3 maal).

Met zekerheid is niet vast te stellen, waar de infectie vandaan kwam, doch met groote waarschijnlijkheid mag worden aangenomen, dat deze afkomstig was uit de lucht, die in het warme, vochtige tropische klimaat steeds rijk aan kiemen is.

Uit deze proeven bleek dus, dat het zooveel meer gecompliceerde gebruik van de gesloten pers geen voordeelen opleverde in vergelijking tot dat van de open pers, wat aangaat de kansen op infectiën van buitenaf.

Om deze reden werd dan ook bij de hieronder beschreven proefnemingen steeds van de open pers gebruik gemaakt.

Op grond van alle bovenbeschreven resultaten is het dus buiten twijfel, dat een monsterneming van het rietsap uit den stengel als regel zonder infectie van buitenaf geschiedde. Het is nog van belang op te merken, dat in die gevallen, waarin — bij het gebruik van de gesloten pers — infectie optrad, deze ten allen tijde door sporevormende bacteriën werd veroorzaakt, terwijl de door mij in de hieronder volgende proefnemingen geïsoleerde bacteriën juist grootendeels uit niet-sporevormers bestonden. Dit is een nadere

aanwijzing, dat bij deze proefnemingen de nimmer geheel te vermijden infectiën toch geen belangrijke rol hebben gespeeld.

§ 6. *Het aantoonen der mikroben in het perssap door kweeking op kultuurplaten.*

Om het verkregen perssap op de aanwezigheid van mikroben te onderzoeken, ging ik op tweeërlei wijze te werk.

Aanvankelijk bepaalde ik mij ertoe, om met behulp van een sterielen platinadraad kleine hoeveelheden van het opgevangen sap op geschikte vaste kultuurplaten af te strijken, waarbij naast elkaar van gelatine- en agarplaten werd gebruik gemaakt. De gebezigde voedingsbodems hadden de volgende samenstelling:

1. Moutgelatine (of -agar):

Leidingwater	100	c.c.
Gelatine	15	G.
(of agar 1½ G.)		
Moutsuiker (Merck)	8	»
Asparagine	0,15	»
K_2 H P O_4	0,05	»

2. Suikerrietsapgelatine (of -agar.)

Gefiltreerd rietsap	100	c.c.
Gelatine	13	G.
(of agar 1½ G.)		
Asparagine	0,15	G.
K_2 H P O_4	0,05	»

3. Glucose peptongelatine (of -agar).

Leidingwater	100	c.c.
Gelatine	15	G.
(of agar 1½ G.)		
Glucose	2	»
K_2 H P O_4	0,05	»

4. Glucose-gistwatergelatine (of -agar).

Gistwater	100	c.c.
Gelatine	15	G.
(of agar 1½ G.)		

Glucose	2 G.
Asparagine	0,1 »
$K_2 H P O_4$	0,05 »

Het gistwater werd verkregen door 50 G. droge gist met 1 liter leidingwater te extraheeren.

De gelatineplaatculturen werden bij 20° C. gehouden, terwijl de agarplaten bleven staan bij kamertemperatuur van pl. m. 30° C.

§ 7. *Het aantoonen van mikroben in het perssap door kweeking in cultuurvloeistoffen.*

De beschreven werkwijze, waarbij slechts een zeer geringe hoeveelheid sap op de kultuurplaten werd gebracht, laat echter plaats voor de mogelijkheid, dat ook in die gevallen, waarin op de platen zich geen koloniën ontwikkelden, het uitgeperste sap toch niet geheel kiemvrij was. Om deze reden besloot ik een gevoeliger methode van onderzoek toe te passen, n.l. die, welke door mij reeds was gebruikt bij de contrôle op de mogelijkheid eener aseptische monsterneming uit gesteriliseerd riet. Daartoe werd dus weer het uitgeperste sap in een steriel buisje in zijn geheel gemengd met een geschikte kultuurvloeistof en nagegaan of, en zoo ja, welke mikroben zich daarin na eenigen tijd ontwikkelden. Als kultuurvloeistoffen werden door mij wederom oplossingen van dezelfde samenstelling gebruikt als hierboven voor de bereiding van de vaste voedingsbodems werd aangegeven.

De practijk leerde, dat bij gebruik van deze gevoeliger methode van onderzoek het geval, waarin geen mikrobenontwikkeling plaats vond, hooge uitzondering werd.

In die gevallen, waarin in de buisjes bacteriëngroei plaats vond, werden deze door mij gedetermineerd, wat bijna steeds zonder meer mogelijk was. In twijfelachtige gevallen werd de cultuurvloeistof op een vasten voedingsbodem afgestreken en zoodoende de natuur der mikro-organismen vastgesteld. Als regel trad echter in ieder buisje slechts één mikrobe op den voorgrond, zoodat de gevallen, waarin op de platen verschillende mikroben zich ontwikkelden, zeldzamer waren.

Verschillende leden van eenzelfden stengel leverden echter in vele gevallen onderling verschillende bacteriënkulturen op.

HOOFDSTUK V.

Het voorkomen van bacteriën in stengels van het normale suikerriet.

§ 1. *Overzicht van de voor het onderzoek gebruikte uiterlijk normale rietstengels.*

In Hoofdstuk I werd gewezen op het feit, dat latere onderzoekingen buiten twijfel hebben gesteld, dat ook het inwendige van uiterlijk geheel normale planten in zekere gevallen niet vrij van mikro-organismen is. Voor het suikerriet wordt hiervan, zooals wij reeds zagen, door mej. Wilbrink terloops melding gemaakt.

Op grond van het in de Inleiding uiteengezette was het echter wenschelijk deze kwestie nog eens aan een uitgebreid onderzoek te onderwerpen.

Hierbij besloot ik om vóór alles aandacht te schenken aan bibitrietplanten, daar deze met veel meer zorg worden gekultiveerd dan het riet van de maalriettuinen, zoodat een positieve uitkomst van het mikrobiologisch onderzoek voor de eerste veel sprekender zou zijn dan voor de laatste. Bovendien bood het gebruik van bibitstengels nog het voordeel, dat daarbij de kans op serehziekte zeer veel geringer is dan bij de normale rietplanten der suikerondernemingen. Dit is van belang, omdat het begrijpelijkerwijze noodzakelijk was bij het onderzoek der normale stengels het in lichte mate serehzieke riet zoo volledig mogelijk uit te sluiten.

Dit laatste is nu dikwijls niet gemakkelijk uit te voeren, omdat de allereerste stadia der serehziekte in de rietplanten zeer bezwaarlijk zijn vast te stellen. Vandaar dat het aanbeveling verdiende, het materiaal te kiezen uit stengels van zooveel mogelijk onberispelijke herkomst.

In het geheel werden 591 normale rietstengels onderzocht, afkomstig van zeer uiteenloopende rietvariëteiten en onder zeer uiteenloopende kultuur-omstandigheden gegroeid.

Onderstaande Tabel I geeft een overzicht van de herkomst en van de variëteiten van het onderzochte riet.

§ 2. *Uitkomsten van het onderzoek.*

De in § I vermelde bibitstengels werden nu geheel onderzocht op de wijze, zooals in het vorige hoofdstuk uitvoerig is beschreven.

Tabel I.

Overzicht van de herkomst en de variëteiten van de onderzochte normale rietstengels.

Herkomst der stengels	Data van onderzoek.	Rietvariëteit.	Aantal onderzochte stengels.
Sf. [1]) Soekowidi. Uit verschillende vlakte-bibittuinen.	10 Juni 1918	247 B	5
		90 F	4
		SW 1	4
		247 B	1
		EK 28	4
		247 B	5
		100 POJ	5
		EK 28	3
		247 B	3
		247 B	4
		EK 28	4
		EK 28	3
		EK 28	2
		EK 28	3
		247 B (Grootmoeder-bibittuin 1920)	3
		EK 28	2
		EK 28	5
		EK 28	2
		SW 3	4
		SW 3	2
		EK 28	4
Bibitonderneming Singosari.	24 Juni 1918	247 B	11
		EK 28	7
		SW 3 (2000 voet hooge tuin)	10
Bandoengbibit. Aanplant firma Hondius.	4 Juli 1918	EK 2	4
		Zwart Cheribon	4
Sf. Remboen.	6 Juli 1918	EK 28	6
Firma Hondius.	5 Aug. 1918	EK 28	4
		90 F	4
Sf. Remboen. Lembang-bibit, firma Hondius.	10 Aug. 1918	EK 28	7
		247 B	17

[1]) Sf. wordt hier en verderop gebruikt als afkorting voor: Suikerfabriek.

Herkomst der stengels.	Data van onderzoek.	Rietvariëteit.	Aantal onderzochte stengels.
Bibitonderneming Singosari.	19 Aug. 1918	EK 28	3
		100 POJ	6
		EK 30	3
		SW 3	3
		SW 111	3
		247 B	3
Salatigabibit.	19 Aug. 1918	90 F	23
Bibitonderneming Singosari.	10 Sept. 1918	DI 52	2
Firma R. J. van der Tuuk. Ampel (Bojolali).	16 Sept. 1918	EK 28	3
		247 B	3
Sf. Padokan. Van firma De Voogt.	17 Oct. 1918	EK 2	8
Bibitonderneming Soemberpoetjoeng.	6 Nov. 1918	DI 52	6
De „Combinatie".	29 Nov. 1918	100 POJ	3
		EK 28	2
		247 B	2
Sf. Winongan.	2 Jan. 1919	SW 3	4
De „Combinatie".	6 Jan 1919	SW 3	7
		SW 772	3
Sf. de Maas.	20 Jan. 1919	EK 28	3
		1228 POJ	2
		2379 POJ	2
Sf. Winongan.	24 Febr. 1919	247 B	3
		100 POJ	3
Sf. Karang-anom.	4 Maart 1919	379 B	3
Bibitonderneming Singosari (Malang).	12 Maart 1919	EK 28	4
		SW 3	4
		SW 111	4
		DI 52	4
De „Combinatie".	21 Maart 1919	100 POJ	3
		DI 52	3
		247 B	3
Sf. Soekowidi.	27 Maart 1919	EK 28	4
		247 B	4
		SW 3	4
Sf. Seloredjo.	11 April 1919	EK 28	8
Sf. Wringinanom.	23 April 1919	100 POJ	4
Sf. Lestari.	30 April 1919	DI 52	4
		100 POJ (3300 voet hooge tuin)	2
Sf. Lestari.	30 April 1919	100 POJ	4
		DI 52	4
De „Bibitcombinatie".	3 Mei 1919	EK 2	3
		EK 28	2

Herkomst der stengels.	Data van onderzoek.	Rietvariëteit.	Aantal onderzochte stengels.
Sf. Sentanen lor.	5 Mei 1919	EK 28	8
		DI 52	8
		EK 2	4
		90 F	4
		247 B	4
		EK Madoe	4
		Zwart Cheribon	4
Preanger Bibitonderneming der Mij. Sentanen lor c.s. (Bibit v. d. Ned.-Ind. Landbouw Mij.).	5 Mei 1919	DI 52	4
		247 B	4
		EK 28	4
		EK 2	4
		EK Madoe	4
		Zwart Cheribon	4
		90 F	4
Sf. Balapoelang van de firma Hondius (Bandoeng).	11 Mei 1919	247 B	3
Sf. de Maas. Uit moedertuin firma Schröder (Toempang).	12 Mei 1919	EK 28	3
Sf. Gesiekan.	12 Mei 1919	247 B	6
Sf. Lestari.	19 Mei 1919	90 F	3
		EK 28	3
		100 POJ	6
Sf. Gondang Lipoero.	19 Mei 1919	EK 2	3
Sf. Djatie.	14 Juni 1919	EK 28	6
De „Bibitcombinatie".	19 Juli 1919	247 B	4
		90 F	4
Combinatie bibitonderneming „Tandjoengsari" (Bandoeng).	18 Aug. 1919	EK 2	3
		DI 52	3
		247 B	3
		EK 28	3
De „Bibitcombinatie".	23 Sept. 1919	EK 28	3
		EK 2	3
		100 POJ	3
		223 Rood	3
Sf. Soekowidi.	22 Oct. 1919	247 B	3
		SW 3	3
Sf. Soekowidi.	30 Oct. 1919	EK 28	15
		247 B	3
		SW 3	6
Bibitonderneming Singosari (Malang).	3 Nov. 1919	SW 3	3
		EK 28	3
De „Bibitcombinatie".	10 Nov. 1919	Zwart Cheribon	3
De „Bibitcombinatie".	8 Dec. 1919	Zwart Cheribon	3
		247 B	3
		Totaal	591

Daarbij bleek, geheel overeenkomstig de verwachting, dat in verschillende gevallen, waarin de kultuurplaten, waarop een kleine hoeveelheid van het perssap werd afgestreken, steriel bleven, toch met behulp van de gevoeliger werkwijze, waarbij van kultuurvloeistoffen werd gebruik gemaakt, de aanwezigheid van mikroben in het perssap kon worden aangetoond.

Aan den anderen kant waren de gevallen, waarin zich direct op de platen zonder meer koloniën ontwikkelden, geenszins zeldzaam. In die gevallen moet het aantal der in den rietstengel aanwezige mikroben dus vrij aanzienlijk geweest zijn.

Al dadelijk moet opgemerkt worden, dat de gevallen, waarin met de gevoeliger methode geen mikroben in het perssap konden worden aangetoond, tot de hooge uitzonderingen behoorden. Dit verschijnsel beperkte zich tot een zestal fraaie, geheel normale, één jaar oude bibitstokken van de rietvariëteiten 100 POJ, EK 28, 247 B, alle afkomstig van een 3000 voet hoogen bergbibittuin te Singosarie. In overeenstemming met deze uitkomst was het feit, dat bij de aanvankelijk gevolgde uitstrijkmethode op gelatineplaten het aantal kiemen in het sap van stengels uit hooge berg-bibittuinen zooveel geringer bleek te zijn dan in het sap uit stengels, welke in de lage vlakten waren gekultiveerd.

Eenerzijds staat het dus vast, dat onder optimale voorwaarden gekultiveerd suikerriet vrij van mikro-organismen is. Anderzijds leert het onderzoek, dat 99% of meer van de geheel normale rietstengels mikroben bevat. Daarbij waren de bacteriën steeds verre in de meerderheid, alhoewel ook somtijds eenige gist- en schimmelsoorten werden aangetroffen.

Aangaande den aard van de aangetroffen mikroben geeft onderstaande Tabel II een denkbeeld. Achter elk der genoemde organismen is de frequentie aangegeven, uitgedrukt in procenten van het totaal aantal onderzochte rietstengels.

Tabel II.

Overzicht van de uitkomsten van het bacteriologisch onderzoek van normale rietstengels.

Bac. mesentericus, Bac. subtilis	72,4%
Bac. megatherium	18,1%
Bact. herbicola	15,8%
Diverse mikroben, waaronder: Aërobacter aërogenes, A. viscosum en Bac. polymyxa	9,3%

Bij de beoordeeling van deze uitkomsten wil ik niet uit het oog verliezen, dat de mogelijkheid bestaat, dat door de kultuurvloeistoffen een andere samenstelling te geven dan de gebruikte, ook andere organismen tot ontwikkeling zouden zijn gekomen

Voor mijn doel was het echter voldoende aan te toonen, dat de normale rietstengels niet kiemvrij zijn, terwijl overigens de voorkeur voor de gebruikte kultuurmedia voortsproot uit den wensch, de samenstelling ervan zooveel mogelijk te doen aanpassen aan die van het rietsap zelf; in het daartoe geschikte jaargetijde werd dan ook steeds van rijp rietsap als kultuurvloeistof gebruik gemaakt. In die gevallen, waarin over bergbibit van superieure kwaliteit kon worden beschikt, werd zelfs het ongekookte, na onderzoek steriel gebleken rietsap als kultuurmedium gebruikt.

HOOFDSTUK VI.

Het voorkomen van bacteriën in stengels van het serehzieke suikerriet.

§ 1. *De diagnose: serehziek der voor het onderzoek te gebruiken rietstengels.*

Alvorens over te gaan tot een beschrijving van het ingestelde bacteriologisch onderzoek van serehzieke rietstengels, zal worden uiteengezet, op grond van welke overwegingen tot de diagnose: serehziek van de onderzochte stengels werd besloten.

Went [1]) noemt een aantal symptomen, die bij serehzieke rietplanten meer of minder duidelijk worden aangetroffen. Daarbij wijst hij er reeds op, dat deze symptomen niet alle tegelijk worden waargenomen. De belangrijkste door Went genoemde kenmerken zijn:

1°. Bij zwaar aangetaste planten zijn de wortels voor het grootste gedeelte afgestorven of in ziekelijken toestand. De zieke wortels vertoonen dikwijls vergomming der vaten.

2°. De stengels blijven meestal kort, wat een gevolg is van het kort blijven der geledingen.

3°. De stand der bladeren is waaiervormig, wat eveneens samenhangt met het kort blijven der geledingen.

---

[1]) J. H. Wakker en F. A. F. C. Went. De ziekten van het suikerriet op Java, 1898, pag. 76. Smith noemt in zijn meermalen aangehaald standaardwerk „Bacteria in Relation to Plant Diseases", Dl. III, pag. 71, een elftal kenmerken, die echter grootendeels aan de beschrijving van Went zijn ontleend.

3°. Bij zwaar aangetaste planten blijft de bladschijf kort en smal en sterft vroegtijdig af. Bij lichtere gevallen vertoonen de bladschijven overlangs geelgroene, z.g. chlorotische strepen.

4°. De knoppen zijn dikwijls gezwollen en loopen gemakkelijk uit, in het bijzonder aan het ondereinde van den stengel, hetgeen de rietplant het uiterlijke voorkomen geeft van het bekende serehgras, Cymbopogon Nardus Rendle.

5°. Bij het doorsnijden van den stengel vallen de roode, met gom gevulde vaatbundels in het oog. Dergelijke verkleurde vaatbundels zijn in het onderste gedeelte van den stok (dongkellan) grooter in aantal dan meer naar boven, waar de roode kleur der vaatbundels zich meer beperkt tot de knoopen.

Voor zoover het plantenmateriaal afkomstig was uit de eigen aanplantingen van het Proefstation, was het nu doorgaans niet bezwaarlijk om op grond van de hiervoor genoemde symptomen tot het serehziek zijn van bepaalde rietplanten te besluiten.

Teneinde echter de beschikking te krijgen over serehziek riet, van verschillende streken van Java afkomstig, was door het Proefstation een rondschrijven gericht aan de administrateurs der verschillende suikerondernemingen, om van typische gevallen van serehziekte in hun aanplant mededeeling te doen en een deel van het aangetaste materiaal op te zenden. In vele gevallen kon ook hier onmiddellijk de conclusie worden getrokken, dat de toegezonden planten inderdaad serehziek waren. In andere gevallen werd dit nader bevestigd door een bezoek aan de betrokken ondernemingen, terwijl in enkele gevallen de bijgevoegde beschrijving voldoende was om allen twijfel aangaande den waren aard der ziekte weg te nemen.

Overigens werd in alle gevallen het mikroskopisch beeld van de in het onderzoek opgenomen rietstengels gecontroleerd. Hierbij bleek, dat overeenkomstig het laatste door Went genoemde symptoom ten allen tijde, althans in de knoopen, roodgekleurde vaatbundels aanwezig waren.

Aangaande de roode kleur der vaatbundels moet nog het volgende worden opgemerkt. Ten tijde dat Went zijn boven kort weergegeven beschrijving der serehsymptomen gaf, was aan het voorkomen van de gomziekte in het suikerriet op Java nog geen aandacht geschonken. Sedert is door de onderzoekingen van Groenewege [1])

[1]) J. Groenewege. De gomziekte van het suikerriet, veroorzaakt door Bacterium vascularum Cobb. Archief voor de Suikerindustrie in Ned.-Indië, 1915, pag. 29.

en vooral van mej. WILBRINK [1]) duidelijk aangetoond, dat ook deze gomziekte aanleiding geeft tot een roode verkleuring en vergomming der vaatbundels. Op grond hiervan heb ik, zooals reeds boven werd uiteengezet, mij dan ook niet tot het kenmerk der roodgekleurde vaatbundels beperkt, om de diagnose: serehziek te stellen. Terwijl intusschen GROENEWEGE van meening is, dat op grond van het mikroskopisch beeld scherp tusschen serehzieke en gomzieke aantasting der vaatbundels kan worden onderscheiden, leverden mijn waarnemingen een bevestiging van het inzicht van mej. WILBRINK, dat dit lang niet altijd met zekerheid kan geschieden. Van ouds is bekend, dat juist het zeefgedeelte der vaatbundels bij serehziek riet in de eerste plaats aangetast wordt. GROENEWEGE zegt echter uitdrukkelijk, dat bij gomzieke planten dit gedeelte der vaatbundels altijd vrij van gom is. Evenals mej. WILBRINK dit opgeeft, bleek mij intusschen, dat bij sterke aantasting door gomziekte de gomvorming ten slotte zoowel op het houtparenchym alsook op het zeefgedeelte van den vaatbundel overgaat.

Uit dit alles volgt, dat men zich niet enkel op het microscopisch onderzoek van den stengel kan verlaten, om met zekerheid uit te maken of de betreffende stengel serehziek is.

Door de bovengenoemde voorzorgsmaatregelen zijn echter voldoende waarborgen verkregen, dat de voor mijn onderzoek gebruikte stengels inderdaad van serehzieke planten afkomstig waren.

§ 2. *Het onderzoek der serehzieke stengels.*

Bij het bacteriologisch onderzoek der serehzieke stengels werd door mij wederom te werk gegaan, als in Hoofdstuk IV beschreven is.

De afzonderlijke onderzoekingen zijn hieronder eenigszins uitvoerig weergegeven. Wat de uitkomsten hiervan aangaat, moet worden opgemerkt, dat in de beschrijving der afzonderlijke proefnemingen in de meeste gevallen alleen is vermeld of Bact. herbicola al of niet werd aangetroffen. Intusschen werd van het voorkomen van andere organismen eveneens aanteekening gehouden, doch de betreffende resultaten zijn uitsluitend collectief in Tabel III vermeld. Dit geschiedde op grond van de overweging, dat het voor het onderzoek der serehzieke stengels toch vrijwel alleen beteekenis had, vast

[1]) G. WILBRINK. De gomziekte van het suikerriet, hare oorzaak en hare bestrijding. Archief voor de Suikerindustrie in Ned.-Indië, 1920, pag. 1419.

te stellen, of daarin ten allen tijde een specifiek mikro-organisme was aan te treffen, terwijl reeds spoedig bleek, dat als zoodanig uitsluitend Bact. herbicola in aanmerking kwam. Bij de ondervolgende beschrijving zijn de onderzochte rietmonsters in het kort aangeduid door achtereenvolgens te vermelden de suikerondernemming, waarvan zij afkomstig zijn, den datum van ontvangst der monsters aan het Proefstation en de rietvariëteit.

1. *Sf. Boedoeran.* 3 Sept. 1917. Rietvariëteit 90 F.

Het ingezonden plantje was omstreeks 3 maanden oud. De stengel vertoonde inwendig het serehziektebeeld, terwijl de overgang van de roode vaatbundels naar de spruit goed was waar te nemen. In den tuin, waaruit dit plantje afkomstig was, waren veel dergelijke planten te vinden. Zoowel de stengel als de bibit werden in onderzoek genomen.

Stengel.

Het hieruit verkregen sap werd dadelijk uitgestreken op een glucose-gistwater-bikaliumphosphaat-gelatineplaat, waarop na 2 dagen een groot aantal koloniën van Bact. herbicola zichtbaar werden.

Bibit.

Het sap uit den bibitknoop werd onmiddellijk op moutgelatine uitgestreken. In 7 dagen werd een kultuur van Bact. herbicola verkregen, die slechts door enkele koloniën van andere mikroben was verontreinigd.

2. *Sf. Peterongan.* Tuin Mlatten koelon. 7 Sept 1917.
Rietvariëteit, 90 F.

De rietplant, die ingezonden was, kwam voor in een tuin, waar meerdere van dergelijke door sereh aangetaste planten aanwezig waren. Ze waren uit bibit van bergimport gekweekt. De uitstoeling was gering. De wortels der planten waren afgestorven. Inwendig waren in het onderste gedeelte van den stok typische roode vaatbundels der serehziekte aan te treffen. Het sap hieruit werd onmiddellijk op een moutgelatineplaat uitgestreken, waarop na 5 dagen talrijke koloniën van Bact. herbicola zichtbaar werden.

3. *Sf. Bandjardawa.* Tuin Gondang. 7 Sept. 1917. Rietvariëteit EK 28.

Ingezonden waren enkele afstervende plantjes, die serehziek wa-

ren. Naast de hoofdspruit waren gemiddeld 10 zijspruiten ontwikkeld. De wortels waren afgestorven. Inwendig was het onderste gedeelte van den stengel doortrokken van roode vaatbundels. Het sap hiervan werd onmiddellijk op moutgelatine uitgestreken, waarop na 4 dagen een rijke koloniënkultuur van Bact. herbicola werd verkregen.

4. *Sf. Ponen.* 14 Sept. 1917. Rietvariëteit Krebet 6.

Beide ingezonden rietplanten waren afstervende. De bladeren waren geheel verdroogd, terwijl de overlangs doorgesneden stengel en bibit duidelijk het serehziektebeeld vertoonden. Overtuigend kon hier worden opgemerkt, dat de roode vaatbundels van uit den aangetasten bibitknoop door den stengelvoet in den stengel overgingen. Het sap hiervan, onmiddellijk op moutgelatine uitgestreken, leverde na 3 dagen uitsluitend koloniën op van Bact. herbicola.

5. *Sf. Ngandjoek.* Tuin Plosso. 15 Sept. 1917. Rietvariëteit 90 F.

Ingezonden waren drie plantjes, welke naast elkander in de plantgeul stonden. De bladkroon was afstervend zonder bijzondere kenmerken. Alle wortels waren inwendig grijs verkleurd en meerendeels afgestorven. Uit de bibit ging een stroom van roode vaatbundels in den stengelvoet over.

De grond, waarin de plantjes stonden, was zware klei.

Bibit en dongkellan werden aan een bacteriologisch onderzoek onderworpen.

Bibit.

Het stukje bibitknoop werd op gebruikelijke wijze uitgeperst en het sap onmiddellijk uitgestreken op een moutgelatineplaat. Na 6 dagen was de plaat bedekt met een reinkultuur van groote, goudgele, ronde koloniën van Bact. herbicola.

Dongkellan.

Het opgevangen perssap werd dadelijk uitgestreken op moutgelatine. Na 7 dagen konden op de plaat dezelfde koloniën van Bact. herbicola als uit het bibitsap verkregen, worden waargenomen.

6. *Sf. Badas.* Tuin Dekes. 16 Sept. 1917. Rietvariëteit EK 2.

De ingezonden rietplant was omstreeks 3 maanden oud. De bladeren waren afstervend en verdroogd. Doorgesneden, vertoonde de stengel inwendig een grijze kleur, waarschijnlijk tengevolge van groeistagnatie. Een onmiddellijke uitstrijking van het uitgeperste

sap op moutgelatine gaf in den tijd van 2 dagen een rijke koloniënkultuur van Bact. herbicola.

7. *Sf. Bogokidoel.* Tuin Semoet. 25 Sept. 1917. Rietvariëteit Tjepiring 24.

Dit ingezonden plantje had een verdroogde bladerkroon en een vrij omvangrijk wortelstelsel, waarvan het meerendeel der wortels was afgestorven. Inwendig had de spruit een klein aantal roode vaatbundels. De bibit was nog voldoend gaaf, om evenals de stengel te worden onderzocht.

Stengel.

Het sap werd dadelijk op moutgelatine uitgestreken en leverde na 5 dagen alleen een tiental koloniën op van Bact. herbicola.

Bibit.

Van den bibitknoop werd het sap onmiddellijk op moutgelatine afgestreken. Na 5 dagen waren hierop 7 koloniën van Bact. herbicola gegroeid naast een groot aantal zeer kleine, bleekgele, iriseerende koloniën van een niet nader gedetermineerde bibitrotmikrobe.

8. *Sf. Winongan.* Tuin Selorentek. 17 Oct. 1917. Rietvariëteit SW 111.

De drie ingezonden planten vertoonden de symptomen der serehziekte. Aan de donkergroene bladeren was niets bijzonders te merken, doch van het vrij goed ontwikkelde wortelstelsel waren de meeste wortels verkleurd en afgestorven. Tot op $^1/_2$ M. hoogte hadden de stengelknoppen spruiten gevormd.

De overlangs gespleten stengels gaven in het ondereinde vele roode vaatbundels te zien, die naar boven in een roode kleur der knoopen overgingen. Een uitstrijking van het sap uit de stengelbasis direct op moutgelatine, gaf een goede kultuur van Bact. herbicola, slechts door enkele koloniën van andere mikroben verontreinigd.

9. *Sf. Kemanglen.* Tuin Doekoesabil. 23 Oct. 1917. Rietvariëteit EK 2.

De drie ingezonden rietplanten hadden deels verdroogde, deels vergeelde bladeren. De richting van verdroging liep van den top naar de basis van het blad. Van het wortelstelsel waren vele wortels afgestorven, terwijl van de afstervende wortels de inhoud begon te

verkleuren. Het onderste gedeelte der stengels vertoonde roode vaatbundels.

Bij directe uitstrijking van het perssap der zieke stengels op moutgelatine werden duidelijke koloniën van Bact. herbicola verkregen.

10. *Sf. Perning.* 11 Dec. 1917. Rietvariëteit EK 28.

De ingezonden spruit had in hevige mate pokkabong, [1]) terwijl de stengel inwendig in alle opzichten de serehsymptomen vertoonde. Een directe uitstrijking van het sap op moutgelatine gaf na 5 dagen koloniën van Bact. herbicola te zien.

11. *Sf. Ngadiredjo.* 11 Dec. 1917. Rietvariëteit 213 POJ.

De ingezonden stokken waren ongeveer 1 M. lang. De bladeren waren geheel verdroogd. Tot op groote hoogte liepen de spruiten aan den stok sterk uit. Over de lengte doorgesneden vertoonden de serehzieke stokken, vooral aan de basis, de sterk gele en roode verkleuring der vaatbundels. Bibits waren niet meer aanwezig. Van één der zieke stengels werd op twee plaatsen uit de aangetaste knoopen sap geperst en afzonderlijk op moutgelatine door directe uitstrijking onderzocht. In 5 dagen verschenen op elke plaat ongeveer 150 koloniën van Bact. herbicola, verontreinigd met slechts enkele koloniën van Aërobacter aërogenes.

12. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 19 Dec. 1917. Rietvariëteit 2031 POJ.

Deze stok vertoonde inwendig op de knoopen het serehziektebeeld der rood verkleurde vaatbundels. Een directe uitstrijking van het sap op moutgelatine gaf de volgende mikrobenflora.

a. Ruim 20 koloniën van Bact. herbicola.
b. Een paar honderd koloniën van Bac. megatherium.
c. Ongeveer 10 koloniën van Aërobacter aërogenes.
d. Omstreeks 150 zeer kleine, doorzichtige, koloniën van staafvormige bacteriën, welke ten deele tot draden vereenigd waren en de gelatine niet vervloeiden.

13. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 22 Dec. 1917. Rietvariëteit 2031 POJ.

Uit het sap van dezen zwaar serehzieken stok van ongeveer

[1]) Onder pokkabong (een Javaansch woord, dat „gebroken spruit" beteekent) verstaat men het verschijnsel, dat de jongste, nog opgerolde bladeren harmonicaachtig in elkander geschoven zijn.

1 M. lang, werd zoowel van den top als van de basis een directe uitstrijking op moutgelatine gemaakt, die na 7 dagen het volgende resultaat gaf.

Stengeltop.

Op de plaat verscheen een reinkultuur van 12 Bact. herbicola-koloniën.

Stengelbasis.

Naast 15 koloniën van Bact. herbicola kwamen 4 koloniën van Aërobacter aërogenes voor.

14. *Sf. Winongan.* 29 Dec. 1917. Rietvariëteit Gestreept Preanger.

De ingezonden serehzieke stengel van omstreeks 3 M. hoog gaf bij directe uitstrijking van het perssap op moutgelatine een kultuur van ongeveer 70 koloniën van Bact. herbicola in den tijd van 5 dagen.

15. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 8 Jan. 1918. Rietvariëteit 247 B.

Van een twee-oogsbibit had zich de eene knop ontwikkeld tot een normale plant van ongeveer 2 M. lang, en de andere tot een dun serehziek stengeltje van bijna $1^1/_2$ M. lengte.

Het bibiteinde, waaruit de vaatbundels naar den serehzieken stok verliepen, verkeerde reeds in alkalisch bederf.

Het perssap van den gezonden stengel leverde op moutgelatine slechts koloniën op van Aërobacter aërogenes in 3 dagen, terwijl het sap van den serehzieken stok, uit den top afkomstig, eveneens op moutgelatine in denzelfden tijd 4 koloniën gaf van Bact. herbicola naast de genoemde mikrobe.

16. *Sf. Pleret.* Tuin Pilang lor. 15 Januari 1918. Rietvariëteit SW 16.

Van een ingezonden serehzieken stok, die inwendig over een groote lengte roode, serehzieke knoopen bezat, werden 3 bibits gesneden en elk in een pot uitgeplant op 17 Januari 1918. Twee dezer bibits kiemden, terwijl de derde bezweek. De twee spruiten groeiden op tot flinke plantjes met een frisch voorkomen en donkergroen blad. Op 14 Maart werd één der beide plantjes inwendig onderzocht. Daartoe werden stengel en bibit gezamenlijk overlangs doorgesneden. Fraai en overtuigend was hierbij te zien, hoe een vuurroode stroom

van serehzieke vaatbundels uit den serehzieken knoop in den stengel overging. Niettegenstaande het frissche en groene uiterlijk bleek het plantje inwendig reeds zwaar te zijn aangetast.

Van dergelijke planten is bij ervaring bekend, dat zij bij watergebrek spoedig te gronde gaan. Het gunstige aanzien moet zonder twijfel worden toegeschreven aan de rijkelijke watervoorziening bij de potkultuur.

De andere plant had op 15 Mei reeds 14 zijspruiten gevormd. Sneed men deze aan, dan was de inhoud vuurrood door sereh-aantasting. Op 17 Mei werd zulk een serehzieke spruit onderzocht. Bij cultiveering in glucose-pepton-bikaliumphosphaat-oplossing gaf het sap der zieke spruit aanleiding tot ontwikkeling van Bact. herbicola.

Na ongeveer 9 maanden, op 23 October, werd de hoofdspruit op 3 plaatsen, en wel nabij den top, in het midden en eenige c.M. boven den voet, onderzocht. De horizontale doorsnede vertoonde talrijke serehzieke, roode vaatbundels. De mikroben uit het perssap werden in moutextract gekultiveerd gedurende 2 dagen en daarna op moutgelatine uitgestreken. In de 3 gevallen werden in den tijd van 4 dagen talrijke koloniën verkregen, uitsluitend van Bact. herbicola. Een onmiddellijke uitstrijking van het perssap op moutgelatine gaf in denzelfden tijd omstreeks 40 van deze mikrobenkoloniën als reincultuur.

17. *Sf. Pengkol.* Tuin Boegoelkidoel. 31 Januari 1918. Rietvariëteit 247 B.

Het sap uit het onderdeel van den stengel werd, na 2 dagen staan, verdund en op moutgelatine uitgestreken. In den tijd van 6 dagen werd een dichte koloniënkultuur van Bact. herbicola verkregen.

18. *Sf. Ngandjoek.* Tuin Plosso. 4 Februari 1918. Rietvariëteit 90 F.

Ruim $4^1/_2$ maand na de vorige inzending werd wederom uit tuin Plosso een halfvolwassen plant van de rietsoort 90 F ontvangen. Deze had in alle opzichten het uiterlijk van een serehzieke plant. Van het wortelstelsel waren vele wortels afgestorven. Over de lengte doorgesneden, vertoonden de dongkellan en de hooger gelegen stengelleden een groot aantal rood gekleurde vaatbundels, om ten slotte in de bovenste knoopen over te gaan in de typische roode kleur van de door sereh aangetaste knoopen, die op lengte-doorsnede zich

voordoen als roode puntjes en komma's. De uitgeloopen worteloogen vormden een wortel-viltmassa nabij alle knoopen over een groot deel van den stengel. Ook alle spruiten waren evenals de hoofdstengel door sereh aangetast. Het perssap van dezen serehzieken stengel werd direct afgestreken op een moutgelatineplaat. Na 8 dagen waren twee mikrobensoorten hierop duidelijk te onderscheiden, n.l. Bact. herbicola en Aërobacter aërogenes.

19. *Sf. Pengkol.* Tuin Kedjobo. 14 Februari 1918. Rietvariëteit 247 B.

De stok vertoonde inwendig op de knoopen door sereh aangetaste roode vaatbundels. Het sap, afkomstig van het onderste gedeelte van den stengel, op moutgelatine gebracht, gaf na 6 dagen naast koloniën van Bact. herbicola ook eenige koloniën van Bact. vulgare.

20. *Sf. Pengkol.* Tuin Kedjobo. 14 Febr. 1918. Rietvariëteit 247 B.

Aan het uitgeperste sap van den serehzieken stengel werd een weinig moutextract toegevoegd. Na 4 dagen staan werd een weinig bacteriënmateriaal van deze kultuur op moutgelatine uitgestreken, waaruit na 6 dagen een dichte koloniënkultuur van Bact. herbicola ontstond.

Ook het onderzoek van de bibit, op dezelfde wijze uitgevoerd, leverde na denzelfden tijd koloniën op van Bact. herbicola en Aërobacter aërogenes.

21. *Sf. Pengkol.* Tuin Kedjobo. 15 Febr. 1918. Rietvariëteit 247 B.

De isolatie geschiedde door toevoeging van moutextract aan het perssap, uit den top van den serehzieken stok verkregen. Na 1 dag staan werd hieruit een streepkultuur op moutgelatine gemaakt. Na verloop van 6 dagen werd een kultuur van Bact. herbicola verkregen.

Het onderzoek van een tweeden serehzieken stengel, op dezelfde wijze met het sap uit den top verricht, gaf na 6 dagen een rijke kultuur van Bact. herbicola, echter vermengd met Aërobacter aërogenes.

22. *Sf. Ngadiredjo.* 22 Febr. 1918. Rietvariëteit EK 2.

De inzending bestond uit eenige stokken van omstreeks 2 M. lengte. De bladkronen waren reeds aan het verdrogen. De stengel-

knoppen waren over een groote lengte van den stok uitgeloopen. Overlangs doorgesneden vertoonden de stokken in het onderste gedeelte een groot aantal serehzieke, roode vaatbundels, die leden en knoopen doortrokken. Van omstreeks het midden van den stengel naar boven hadden alleen de knoopen gele en roode vaatbundels, om in de nabijheid van den top over te gaan in een slechts gele verkleuring van de vaatbundels der knoopen. De verkleurde vaatbundels in de knoopen gingen steeds over in de uitgeloopen spruiten.

Van de kultuur in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat werd, na 2 dagen staan, een weinig op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling afgestreken. In 4 dagen tijd werd daarop een dichte koloniënkultuur verkregen van Bact. herbicola.

23. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Poeroet. 23 Febr. 1918. Rietvariëteit Cristalina Cuba (Wit Preanger).

Het sap uit den top van den serehzieken stengel werd 36 uren aan zichzelf overgelaten en daarna werd een weinig van het verkregen bacteriënmateriaal op moutgelatine uitgestreken. Na 6 dagen verschenen hierop talrijke koloniën van Bact. herbicola.

24. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 25 Febr. 1918. Rietvariëteit 2045 POJ.

Na kultiveering der mikroben uit het perssap van den serehzieken stok in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat, werden deze op een gelatine-voedingsbodem van gelijke samenstelling afgestreken. In 8 dagen werd een goede kultuur verkregen van Bact. herbicola.

25. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Poeroet. 25 Febr. 1918. Rietvariëteit White Transparant (Cuba).

Met behulp van moutextract werden uit het sap van den serehzieken stok de mikroben gekweekt en daarna uitgestreken op moutgelatine. Na 7 dagen vertoonden zich de koloniën van Bact. herbicola op de plaat.

26. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 26 Febr. 1918. Rietvariëteit 2040 POJ.

De kultuur in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat der mikroben uit het sap uit een serehzieken knoop van den stengeltop gaf bij een uitstrijking van een weinig bacteriënmateriaal op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling een rijke koloniënkultuur van Bact. herbicola.

27. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Poeroet. 26 Februari 1918. Rietvariëteit Mangli Java S.

Van dezen serehzieken stok, waarbij het serehsymptoom der roode vaatbundels in de knoopen naar den top toe geleidelijk verdween, werd uit een op het oog geheel blanken knoop sap uitgeperst, waaraan wat glucose-gistwater-bikaliumphosphaat werd toegevoegd. Na verloop van 2 dagen werden de mikroben op een gelatine-voedigsbodem van dezelfde samenstelling afgestreken. In 6 dagen verscheen hierop een dichte koloniënkultuur van Bact. herbicola.

28. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Poeroet. 28 Februari 1918. Rietvariëteit Red-Mappoo (Australië).

In het perssap uit een nagenoeg blanken knoop uit den serehzieken stengel kon door kultuur in moutextract na 8 dagen Bact. herbicola worden aangetoond.

29. *Proefstation Pasoeroean.* 6 Maart 1918. Rietvariëteit. Demarara 74.

Van dezen serehzieken stok waren de knoopen doortrokken van roode vaatbundels. De mikroben uit het sap der aangetaste knoopen werden gekultiveerd in moutextract en na 2 dagen op moutgelatine afgestreken. De aangetroffen mikrobenflora, in den tijd van 7 dagen op de plaat gegroeid, bestond uit:

a. Bact. herbicola.
b. Talrijke koloniën van Bact. fluorescens liquefaciens.
c. Vele koloniën van Bact. vulgare.

30. *Proefstation Pasoeroean.* 6 Maart 1918. Rietvariëteit Teboe Soerat Paijoeman.

Het ondereinde van dezen serehzieken stok was sterk, het middendeel minder en de top slechts zeer zwak aangetast. Hierin waren ook kleurlooze knoopen te vinden, in het sap waarvan Bact. herbicola werd aangetoond.

31. *Proefstation Pasoeroean.* 6 Maart 1918. Rietvariëteit Melawan Java S.

Inwendig vertoonde deze rietstok op de knoopen serehzieke vaatbundels. Het sap van een aangetasten knoop uit het midden van den stengel bevatte wederom Bact. herbicola.

32. *Proefstation Pasoeroean.* 9 — 16 en 24 Maart 1918. Rietvariëteit 247 B.

Om de serehzieke stengeltjes in het aanvangsstadium te kunnen onderzoeken, werden plantjes gekweekt uit serehzieke bibits. Deze waren verkregen uit serehzieke stokken van de Sf. Pengkol, Tuin Boegoelkidoel en in potten uitgeplant op 22 Jan. 1918. Hierbij werden de zieke, met roode vaatbundels doortrokken knoopen onderzocht.

1ste Serehzieke stengel.

Op 9 Maart werd een der plantjes onderzocht. Bij het aansnijden van de spruit tot op de bibit was duidelijk waar te nemen, hoe fijne roode vaatbundeltjes van uit den sterk rood verkleurden knoop in de spruit overgingen. Aan weerskanten van den bibitknoop was de bibitinhoud nog geheel blank, zoodat de overgang der roode vaatbundels uit den knoop naar den stengel zeer fraai en overtuigend te zien was. Alle roode vaatbundels lagen in een geel verkleurd veld. Het sap gaf in moutextract na een paar dagen een kultuur van Bact. herbicola.

2de Serehzieke stengel.

Den 16den Maart werd nogmaals een plantje onderzocht. Inwendig vertoonden bibit en spruit dezelfde serehsymptomen als bij het voorgaande geval. Het sap gaf in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat na eenige dagen Bact. herbicola. Een weinig van de kultuurvloeistof, op glucose-gistwater-bikaliumphospaat-gelatine uitgestreken, gaf na 4 dagen een kultuur van:

a. Vele koloniën van Bact. herbicola.
b. Talrijke koloniën van Aërobacter aërogenes.
c. Ruim 200 „wingerdbladvormige" koloniën, die vlak, doorzichtig en bleekwit waren en veel overeenkomst hadden met koloniën van Aërobacter coli.

3de Serehzieke stengel.

Op den 24sten Maart werd een derde zieke spruit onderzocht, die inwendig duidelijk de rood gekleurde serehzieke vaatbundels te zien gaf. De mikrobenkultuur geschiedde in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat. Na eenige dagen werd een weinig afgestreken op een gelatinevoedingsbodem van dezelfde samenstelling, die in 7 dagen een reinkultuur van Bact. herbicola gaf. Naast deze mikrobe hadden

zich in het sapbuisje boterzuurbacteriën ontwikkeld, herkenbaar aan het gevormde boterzuur en de blauwe kleur der mikroben bij toevoeging van jodium. Als echte anaëroben konden zij zich niet op de aërobe kultuurplaat ontwikkelen.

33. *Proefstation Pasoeroean.* 14 Maart 1918. Rietvariëteit Zwart Cheribon.

Een serehzieke bibit werd op 25 Januari in een pot geplant. De verkregen spruit werd op 14 Maart onderzocht. Het sap, in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat gebracht, gaf na 10 dagen een dikke, gele mikrobenmassa, die op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling werd uitgestreken. In 6 dagen verschenen op de plaat alleen koloniën van Bact. herbicola, doch in 3 verschillende kolonie-vormen.

34. *Proefstation Pasoeroean.* 18 Maart 1918. Rietvariëteit Lahaina.

Uit het perssap van den serehzieken stengel werden de mikroben gekultiveerd in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat en na 8 dagen uitgestreken op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling. In 4 dagen werd een dichte koloniënkultuur verkregen van Bact. herbicola.

35. *Sf. Petjangaän.* 19 Maart 1918. Rietvariëteit EK 1.

De inzending bestond uit een rietpol, waarvan de toppen der stengels afgesneden waren. Op overlangsche doorsnede der stokken werden de serehsymptomen der gele en roode vaatbundels op de knoopen aangetroffen. De mikroben uit het sap van deze knoopen werden gebracht in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat en daarna op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling uitgestreken. Er werd een kultuur van Bact. herbicola verkregen, welke na verloop van 10 dagen groote koloniën te zien gaf.

36. *Proefstation Pasoeroean.* 20 Maart 1918. Rietvariëteit Zwart Cheribon.

Deze sterk serehzieke stok vertoonde op de knoopen uitgeloopen wortels, die tot een wortelvilt waren ineengegroeid. Inwendig nam de aantasting van den stok van beneden naar boven af, hetgeen merkbaar was aan de lange roode vaatbundels in het onderdeel van den stengel, die geleidelijk overgingen in rood gekleurde puntjes in de knoopen van den top. De mikroben, uit het sap van de stengelbasis verkregen, werden in moutextract gekultiveerd en na eenige

dagen op moutgelatine uitgestreken. Deze plaat gaf na 7 dagen een rijke kultuur van Bact. herbicola.

37. *Proefstation Pasoeroean.* 25 Maart 1918. Rietvariëteit 90 F.

De mikroben uit het perssap van de serehzieke knoopen van den stok werden gedurende 2 dagen in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat gekultiveerd. De verkregen bacteriën werden daarna op een gelatine-voedingsbodem van gelijke samenstelling afgestreken. Hierop verschenen na 4 dagen koloniën van Bact. herbicola.

38. *Sf. Padokan.* Vlaktebibittuin Drowo. 9 April 1918. Rietvariëteit EK 2.

In dezen tuin stierven de bibitplanten plaatselijk af, hetgeen ook door de droogte in de hand gewerkt werd. Pokkabong kwam voor, terwijl de stokken inwendig in het algemeen de roode vaatbundels niet duidelijk vertoonden, op een enkele hoofdspruit na, die op de knoopen een duidelijk serehzieke roode en gele verkleuring der vaatbundels te zien gaf. Bij onderzoek van het sap uit den stengel kon Bact. herbicola worden aangetoond.

39. *Sf. Petaroekan.* Bibittuin Gempol. 12 April 1918. Rietvariëteit EK 2.

De drie ingezonden rietplanten waren afkomstig uit een tuin, die in Februari van genoemd jaar zeer veel van regens en bandjirs geleden had. Vele knoppen v nade[3] omstreeks $/_4$ M. hooge stokken waren tot spruiten uitgeloopen. Het wortelstelsel was grootendeels afgestorven. Inwendig vertoonden de stengels de roode vaatbundels der serehzieke knoopen. Het sap werd in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat gebracht. Na 1 dag werd het verkregen mikrobenmateriaal afgestreken op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling. In den loop van 5 dagen werd een rijke koloniënkultuur zichtbaar van Bact. herbicola.

40. *Sf. Bandjardawa.* 16 April 1918. Rietvariëteit 221 B. Tuin Gondang.

Drie toegezonden rietpollen bestonden uit stokken, waarvan eenige een lengte hadden bereikt van 4,30 M. De langste stokken waren voor het grootste gedeelte van hun lengte voos, terwijl bij sommige stokken tot op groote hoogte de knoppen waren uitgeloopen en afgestorven. De overlangs doorgesneden stengels vertoonden het typische beeld der serehziekte, n.l. een sterk gele kleur der

knoopen, doortrokken van kommavormige roode en gele vaatbundels. Bij de nog levende uitgeloopen knoppen waren de roode vaatbundels van de knoopen in de spruiten overgegaan.

De door sereh aangetaste knoopen werden op $1^1/_2$ meter beneden het vegetatiepunt onderzocht. Het uitgeperste sap werd uitgestreken op glucose-gistwater-bikaliumphosphaat-gelatine. Na 5 dagen kwamen duidelijk twee mikrobensoorten op de plaat voor, en wel ongeveer 20 koloniën van Bact. herbicola naast eenige honderden van Aërobacter aërogenes.

41. *Proefstation Pasoeroean.* 24 April 1918. Rietvariëteit 2067 POJ.

Van dezen serehzieken stok werden de mikroben uit de zieke knoopen in moutextract gekultiveerd en na 2 dagen op moutgelatine afgestreken. In 4 dagen werd hierop een reinkultuur verkregen van Bact. herbicola.

42. *Sf. Tjomal.* 27 April 1918. Rietvariëteit Tjepiring 24.

De inzending bestond uit vijftien stokken, waarvan enkele door groeistagnatie leden van gedrongen vorm hadden; de uitgeloopen wortels hadden een wortelvilt gevormd. Op de knoopen vertoonden slechts sommige stokken inwendig de gele en geelroode verkleuring der serehzieke vaatbundels. In 5 onderzochte stokken kon, met behulp van moutextract, de aanwezigheid van Bact. herbicola worden vastgesteld. Ter contrôle werden de mikroben uit 2 der moutextractbuisjes na 8 dagen op moutgelatine afgestreken. Beide platen gaven na 6 dagen een rijke kultuur van Bact. herbicola.

43. *Sf. Modjopanggoeng.* 6 Mei 1918. Rietvariëteit EK 2.

Uit een bibittuin dezer onderneming werden twee planten ingezonden, die alle verschijnselen der serehziekte vertoonden. De jongste bladeren waren aan het afsterven. Over een groot gedeelte van den stok liepen de stengelknoppen uit. Overlangs doorgesneden vertoonde de stengel op de onderste knoopen slechts een geringe sereh-aantasting, terwijl de knoopen nabij den top vuurrood gekleurde vaatbundels te zien gaven en onderling zoowel door roode, maar vooral door geelverkleurde vaatbundels verbonden waren. Dit beeld der serehaantasting wordt weleens aangeduid met den naam van „omgekeerd serehbeeld." Ook de uitgeloopen oogen bleken serehziek te zijn. Met behulp van moutextract kon in het sap der zieke stokken Bact. herbicola worden aangetoond.

44. *Sf. Poerwodadie.* 7 Mei 1918. Rietvariëteit SW 1.

Van zes rietstokken waren de ondereinden ingezonden. Overlangs doorgesneden vertoonden de stokken in de knoopen serehzieke, roode vaatbundels op een geel veld. Na kultiveering der mikroben uit het sap van een aangetasten knoop, gedurende 3 dagen in moutextract, werd een weinig hiervan afgestreken op glucose-gistwater-bikaliumphosphaat-gelatine. Na eenige dagen gaf de plaat koloniën te zien van:

a. Bact. herbicola.

b. Bac. megatherium.

In het kultuurbuisje waren naast deze beide mikrobensoorten, met behulp van de jodiumreactie, boterzuurbacteriën aan te toonen.

45. *Firma L. Karthaus.* Kepandjen. 10 Mei 1918. Rietvariëteit Zwart Cheribon.

De ingezonden stok bezat korte, gedrongen stengelleden. Langs de lengte doorgesneden vertoonde de stok op alle knoopen het fraaie serehsymptoom der geelrood verkleurde vaatbundels.

De kultiveering der bacteriën uit de aangetaste knoopen geschiedde in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat gedurende 3 dagen. De verkregen mikroben werden op een gelatinevoedingsbodem van dezelfde samenstelling gekweekt. Hierop verschenen na 2 dagen een groot aantal koloniën van Bact. herbicola.

46. *Sf. Sempalwadak.* 12 Mei 1918. Rietvariëteit SW 3.

Deze suikeronderneming is gelegen op een hoogte van 1200 voet. De ingezonden rietstengel vertoonde overlangs doorgesneden typische serehzieke knoopen met roodgekleurde vaatbundels. De buiskultuur der mikroben uit de zieke knoopen in moutextract duurde slechts een enkel etmaal. Daarna werden de gekweekte bacteriën op moutgelatine uitgestreken, die na 4 dagen een kultuur gaf van Bact. herbicola.

47. *Sf. Sedajoe.* Tuin Soenapan. 16 Mei 1918. Rietvariëteit 139 POJ.

Van de vier ingezonden stokken waren de bladeren en wortels verwijderd. Op overlangsche doorsnede bleken de stokken voos met een roode verkleuring in het merg. De stokken vertoonden vooral in den top de typische roode verkleuring der serehzieke vaatbundels in de knoopen. De bacteriën uit de serehzieke knoopen van den top

werden in moutextract gekultiveerd en daarna op moutgelatine afgestreken. De plaatkultuur leverde koloniën van Bact. herbicola.

48. *Proefstation Pasoeroean.* 17 Mei 1918. Rietvariëteit SW 16.

Van een serehziek bibitplantje werd de spruit onderzocht. Doorgesneden vertoonde het ondereinde van den stengel de serehzieke, sterk roodgekleurde vaatbundels. De mikroben uit het sap van de zieke spruit, in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat gekultiveerd, werden na 2 dagen op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling gekweekt. Na 2 dagen verschenen hierop talrijke koloniën van Bact. herbicola.

49. *Sf. Lestari.* 18 Mei 1918. Rietvariëteit 2560 POJ.

De ingezonden stok vertoonde een typisch serehbeeld, n.l. korte leden met wortelvilt op de knoopen, inwendig roode vaatbundels, die naar boven toe overgingen in roode puntjes op de knoopen. Het kultiveeren der mikroben uit den zieken stok geschiedde in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat. Na 4 dagen werd afgestreken op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling, die in den loop van 4 dagen de volgende mikrobenflora opleverde:

a. Een aantal kenmerkende koloniën van Bact. herbicola.

b. Talrijke kleine vervloeiende koloniën van Bact. fluorescens liquefaciens.

50. *Sf. Sedajoe.* 23 Mei 1918. Rietvariëteit 1101 POJ.

De ingezonden stengel bleek een typische serehzieke stok te zijn en was inwendig tot aan den top aangetast. Voor het bacteriologisch onderzoek werd de stengel in drie deelen verdeeld en het sap van elk der deelen gebracht in glucose-gistwater-bikaliumphosphaat. Na een paar dagen volgde een uitstrijking van de verkregen mikroben op een gelatine-voedingsbodem van gelijkes amenstelling als de vloeistof der buiskultuur.

a. Een serehzieke knoop uit den top leverde na 6 dagen een reinkultuur op van Bact. herbicola.

b. Een knoop uit het middendeel gaf een kultuur van Aërobacter aërogenes.

c. Een knoop uit het onderste gedeelte leverde slechts koloniën van Bac. mesentericus.

51. *Sf. Padokan.* 23 Mei 1918. Rietvariëteit EK 28.

De inzending bestond uit achttien stokken, waarvan vele op

lengtedoorsnede het serehziektebeeld der roode vaatbundels vertoonden, die tot hoog in den stengel zichtbaar waren. Onder de uitgeloopen spruiten waren enkele eveneens serehziek. Met behulp van moutextract kon Bact. herbicola worden aangetoond. Hiernaast kwamen voor Bac. megatherium en Bac. mesentericus.

52. *Proefstation Pasoeroean.* 24 Mei 1918. Rietvariëteit Teboe Bali (Watampone).

De onderzochte plant was slechts $^3/_4$ M. hoog. Het ondereinde van den stengel vertoonde op doorsnede duidelijk roode serehzieke vaatbundels. Het aantal gevormde nevenspruiten was vrij groot. In de zieke knoopen werd Bact. herbicola aangetoond.

53. *Sf. Langsee.* Tuin Karapan. 15 Juli 1918. Rietvariëtet EK 2.

Er waren vijf plantjes uit één-oogsbibit ingezonden van omstreeks 40 dagen oud. De spruiten waren reeds afstervend en zelfs de jonge, nog niet ontplooide bladeren geheel verdroogd. De wortels bleken grootendeels reeds afgestorven. Van de bibits was de inhoud geheel verrot en donker verkleurd. De bibitknoop was geel verkleurd en doortrokken van roode vaatbundels, die in de spruit overgingen en hier het bekende serehsymptoom gaven. Van de 5 stengels werden 2 voor het inwendig onderzoek geheel versneden. Van de 3 overblijvende, die ook hevig bleken aangetast, gaf het uitgeperste sap, na vermenging met moutextract, reeds na één dag een kultuur van Bact. herbicola.

54. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 20 Juli 1918. Zaailing 498 F 2c.

De stok vertoonde inwendig op de knoopen door sereh aangetaste roode vaatbundels. Het sap uit de zieke knoopen werd vermengd met glucose-gistwater-bikaliumphosphaat, waarna de gekweekte mikroben op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling werden uitgestreken. Na 3 dagen werd een rijke kultuur van Bact. herbicola verkregen.

55. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 20 Juli 1918. Zaailing 427 F c.

Deze serehzieke stok, met geen andere bijzonderheden dan bij het voorgaande geval, werd op gelijke wijze onderzocht. De directe uitstrijking op glucose-gistwater-bikaliumphosphaat-gelatine gaf ruim 100 koloniën uitsluitend van Bact. herbicola.

56. *Sf. Ngelom.* 23. Aug. 1918. Rietvariteit Koesoemo.

De ingezonden rietstengel had in hevige mate pokkabong. Inwendig waren knoopen en leden doortrokken van bruinroode vaatbundels. Door kultiveering der bacteriën in glucose-pepton-bikaliumphosphaat-oplossing kon in het sap uit den rietstengel Bact. herbicola worden aangetoond.

57. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 26 October 1918. Rietvariëteit Krebet 6.

In eenige plantgeulen van deze rietvariëteit stierven bijna alle planten af. Bij onderzoek bleken de slecht ontwikkelde wortels bijna alle afgestorven. Werden stengel en bibit overlangs doorgesneden, dan kon men duidelijk waarnemen, hoe de donkerbruin, bruinrood en geel verkleurde vaatbundels in den stengel hun oorsprong hadden in de bibit. Na kultiveering der mikroben uit het sap der serehzieke knoopen gedurende 2 dagen in moutextract, werd hiervan een weinig afgestreken op moutgelatine, hetgeen na 3 dagen een reinkultuur van Bact. herbicola opleverde.

Een tweede serehzieke stok, op gelijke wijze onderzocht, bleek meerdere mikrobensoorten te bevatten. In den loop van 10 dagen werden op moutgelatine aangetroffen kolonien van:

a. Bact. herbicola;

b. een gist, waarvan de cellen klein waren en de koloniën wit en glad;

c. Bact. prodigiosum met rozeroode koloniën.

Het onderzoek van de bibit leverde bij kultuur op moutgelatine na 2 dagen alleen koloniën op van Aerobacter aërogenes.

58. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 26 Oct. 1918. Rietvariëteit EK 44.

In de plantgeul stonden eenige zeer slechte planten. Het wortelstelsel was geheel onvoldoend ontwikkeld, terwijl de meeste wortels waren afgestorven. Inwendig was het onderste gedeelte van den stok doortrokken van roode vaatbundels, die uit de bibit kwamen. Alle planten waren typisch serehziek. Van één der stokken werd het persap, dat vrij sterk alkalisch reageerde, onmiddellijk op moutgelatine afgestreken. Na 4 dagen verschenen op de plaat:

a. Ruim 500 koloniën van Bact. herbicola.

b. Talrijke koloniën van Aërobacter aërogenes.

Van een tweeden serehzieken stok werden de mikroben, na kultiveering in moutextract gedurende 7 dagen en daarop volgende sterke verdunning, op moutgelatine uitgestreken. In 4 dagen werden op de plaat zichtbaar:

a. eenige koloniën van Bact. herbicola ;

b. talrijke koloniën van een gistsoort.

59. *Sf. Winongan.* Afd. Ngoeling. Tuin Tongas Wetan. 10 Dec. 1918. Rietvariëteit SW 3.

De ontvangen stokken vertoonden inwendig op de knoopen de roode, serehzieke vaatbundels. In het sap der zieke knoopen kon door kultiveering in moutextract Bact. herbicola worden aangetoond. Op moutgelatine werd hieruit in 6 dagen een reinkultuur dezer mikroben verkregen.

60. *Sf. Winongan.* Tuin Wangkal. 21 Dec. 1918. Rietvariëteit 247 B.

Er waren eenige dunne, serehzieke stokken ingezonden, die inwendig op de knoopen in lichte mate, maar nog duidelijk de roodgekleurde vaatbundels te zien gaven. Op dezelfde wijze als in het voorafgaande geval werd een rijke kultuur van Bact. herbicola verkregen, verontreinigd met een enkele kolonie van Aërobacter aërogenes.

61. *Proefstation Pasoeroean.* Jan., Feb. en Maart 1919. Rietplantjes uit serehzieke één-oogsbibit SW 3.

Van acht plantjes werden achtereenvolgens zoowel de stengel als de bibit onderzocht. Niet alleen na 3 weken, maar ook na 3 maanden in den grond te zijn geweest, vertoonden de bibits nog alle op den knoop de roode, serehzieke vaatbundels. Op drie plantjes na, waren ook beginnend roode vaatbundels in de stengels duidelijk waarneembaar. In al deze gevallen werd in de bibits en serehzieke stengeltjes met behulp van een kultuur in moutextract, gevolgd door een uitstrijking hiervan op moutgelatine, in het sap der aangetaste plantendeelen Bact. herbicola aangetoond.

62. *Proefstation Pasoeroean.* 20 Febr. 1919. Rietvariëteiten Tjepiring 48, 49, 50, 51, 52 en 53.

Bij de zwaar serehzieke planten werden bij alle nummers lage pollen van bouquet-sereh aangetroffen met een groote uitstoeling. Het wortelvilt op de knoopen kwam hier algemeen voor. Overlangs doorgesneden stengels gaven fraai den loop der roode vaatbundels

door leden en knoopen te zien, dikwijls tot nabij het vegetatiepunt. Het sap der aangetaste knoopen, met moutextract gemengd, gaf na eenige dagen voor alle nummers zonder uizondering een sterke ontwikkeling van Bact. herbicola. Bij de zwaar aangetaste stokken trad deze mikrobe vooral in het sap van de toppen der stengels sterk op den voorgrond.

63. *Sf. Ranoepakis*. 23 April 1919. Rietvariëteit EK 28.

De ontvangen stokken waren in het algemeen zeer lang. Onder de dunne stengels werd een typisch serehziek exemplaar aangetroffen met roode vaatbundels in leden en knoopen. In de andere stokken waren knoopen met geel- en roodgekleurde kommavormige vaatbundels geen zeldzaamheid. In moutextract gebracht, leverde het sap uit de aangetaste knoopen in één etmaal een krachtige kultuur van Bact. herbicola op.

64. *Proefstation Pasoeroean*. Tuin Pekoentjen. 4 Juni 1919. Rietvariëteit 1499 POJ.

Van eenige geulen waren meerdere planten serehziek. De stokken van dit 4 maanden oude riet waren ongeveer $^3/_4$ M. lang, terwijl over $^1/_3$ van de lengte de knoopen door sereh waren aangetast. De verkleuring der vaatbundels was geelrood.

Ter kultiveering der mikroben werden voor 4 serehzieke stokken 4 buiskulturen aangelegd, waaruit na 1 dag staan een weinig werd afgestreken op moutgelatine. In 5 dagen werden op de platen reinkulturen verkregen van Bact. herbicola.

65. *Sf. Padokan*. Bibittuin Kadipekso. 10 Juli 1919. Rietvariëteit EK 2.

Van een aantal ingezonden bibitstokken had één der aangetaste stengels 8 uitgeloopen knoppen, die alle serehziek waren, daar de roode vaatbundels uit de knoopen in de stengeltjes overgingen. Hoewel in mindere mate, bleken nog 4 andere stokken inwendig duidelijk door sereh aangetaste knoopen te bezitten. Het sap uit de serehzieke knoopen gaf in glucose-pepton-bikaliumphosphaat-oplossing in 1 à $1^1/_2$ etmaal een krachtige kultuur van Bact. herbicola.

66. *Sf. Winongan*. Afd. Ngempit. 12 Juli 1919. Rietvariëteit 1499 POJ.

Van de ingezonden rietplant waren de stengels zeer dun en vertoonden op lengtedoorsnede van beneden tot boven roode, sereh-

zieke vaatbundels. Daarbij waren nabij den stengeltop de knoopen geel verkleurd. Het sap der aangetaste knoopen, in glucose-pepton-bikaliumphosphaat-oplossing gebracht, gaf na ongeveer 2 dagen een kultuur van Bact. herbicola.

67. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. 31 Juli 1919. Rietvariëteit SW 16.

Deze plant was voor den leeftijd van ruim 6 maanden door serehaantasting veel te kort gebleven, terwijl de stengelleden gedrongen van vorm waren.

In het onderste gedeelte van den stok gaven de knoopen duidelijk serehzieke, roode vaatbundels te zien. Met behulp van moutextract, gevolgd door een uitstrijking op moutgelatine, werd in het sap van verscheidene aangetaste knoopen Bact. herbicola aangetoond.

68. *Sf. Poendoeng.* 5 Aug. 1919. Rietvariëteit 379 B.

De ontvangen stokken waren dun en slechts matig lang, veelal inwendig voos of gedeeltelijk hol. Het onderste gedeelte was geheel verrot, terwijl meer naar boven toe de knoopen geel van kleur waren en roode serehzieke vaatbundels vertoonden, in het geval de stokken niet te ver waren verrot of verdroogd. Het sap der aangetaste knoopen, in glucose-pepton-bikaliumphosphaat-oplossing gebracht, gaf na één dag Bact. herbicola.

69. *Sf. Rendeng.* Bibittuin Pingkol, 1 Sept. 1919. Rietvariëteit EK 2.

Van de ingezonden rietplant van 8 stengels waren de toppen afgesneden voor topstek. Vele stengeloogen waren tot spruiten uitgeloopen. Eenige stokken en spruiten waren duidelijk serehziek, daar zij op lengtedoorsnede geel-roodverkleurde vaatbundels vertoonden. De stokken waren veelal sterk voos en het mergweefsel was door rotting rood gekleurd. Het wortelstelsel van de plant verkeerde in slechten staat. Het sap der typisch door sereh aangetaste knoopen gaf in glucose-pepton-bikaliumphosphaat-oplossing Bact. herbicola.

70. *Sf. Poendoeng.* Tuin Podang. 13 Oct. 1919. Rietvariëteit EK 2.

Deze tuin was beplant met bibit uit import van de firma H. J. Groenenberg te Tjimahi. Van de ingezonden planten waren de bladeren geheel verdroogd. Het wortelstelsel was slecht ontwikkeld en de zijspruiten begonnen sterk uit te loopen. Op overlangsche

doorsnede vertoonden de hoofdspruiten duidelijk het serehziektebeeld der roode vaatbundels, terwijl vooral het onderste gedeelte van de stengels sterk was aangetast. De bibits der plantjes waren geheel verrot. Van de twee onderzochte spruiten gaf het sap, in moutextract gebracht, na ruim één dag een kultuur van Bact. herbicola.

71. *Sf. Perning.* 7 Nov. 1919. Rietvariëteit 1499 POJ.

Van het ingezonden plantje waren de bladeren verdroogd en de wortels slecht ontwikkeld. Inwendig vertoonde de stengelvoet serehzieke, roode vaatbundels. Met het sap uit den stengel werden 6 buiskulturen met glucose-pepton-bikaliumphosphaat-oplossing aangelegd. Hiervan gaven 4 buizen met sap uit het topeinde in één etmaal een kultuur van Bact. herbicola, terwijl de buizen met sap uit den stengelvoet Aërobacter aërogenes gaven.

72. *Sf. Perning.* 8 Nov. 1919. Rietvariëteit Tjepiring 24.

In alle opzichten was het ingezonden rietplantje serehziek. De stengelvoet was geheel doortrokken van roode vaatbundels, terwijl iets hooger de knoopen slechts roode puntjes vertoonden. Na kultuur van de mikroben uit het sap in glucose-pepton-bikaliumphosphaat-oplossing gedurende ruim één etmaal, werd hiervan een weinig afgestreken op een gelatine-voedingsbodem van dezelfde samenstelling. Na 2 dagen waren de koloniën van Bact. herbicola opgekomen naast Aërobacter aërogenes.

73. *Sf. Pradjekan.* 12 Nov. 1919. Rietvariëteit (vermoedelijk) EK 28.

Van het ontvangen plantje was het ondereinde van de hoofdspruit geheel bruin verkleurd en verdroogd, doortrokken van sterk verkleurde vaatbundels, die op minder sterk aangetaste plekken de roode kleur hadden van serehzieke vaatbundels. Ook de nevenspruiten bezaten deze verkleurde vaatbundels. Het rottingsproces in de hoofdspruit verkeerde reeds in een vergevorderd stadium, duidelijk riekend naar ammoniak. Vermoedelijk in verband hiermede leverde het sap uit de hoofdspruit ditmaal geen Bact. herbicola op. Wel werd Aërobacter aërogenes aangetoond. Van de beide minder aangetaste nevenspruiten gaf het sap bij kultiveering in glucose-pepton-bikaliumphosphaat-oplossing in ruim één etmaal een kultuur van Bact. herbicola.

74. *Proefstation Pasoeroean.* Tuin Pekoentjen. Dec. 1919 — Maart 1920.

Achtereenvolgens werden de ondervolgende duidelijk serehzieke stokken onderzocht met behulp van moutextract of glucose-peptonbikaliumphosphaat-oplossing.

De onderzochte serehzieke stengels, 67 in aantal, omvatten de volgende variëteiten: 247 B, EK 40, Fidji, DI 46, Makasser 1A, 2714 POJ, DI 52, Port Mackay, Mauritius S.st., Rood Baloeng (Annam 3) 1918, Bangsa Padangsche Bovenlanden, S., Big Tanna Louisiana 1914 st., Soerat Java S. (Zwart Cheribon, rood gestreept), Zwart Borneo Groenenberg 1912, Zwart Dik Duitsch Nieuw-Guinea, S., Timorriet S., Boengaja Bali 1915 st., Idjo Hawaii S., Cantoon White (Formosa) 1916, Geel gestreept Batjan, Groen Batjan import Salatiga 1917, Poetih Menado S. st., Ancha Formosa 1916.

In 65 van de 67 stokken werd Bact. herbicola aangetroffen.

§ 3. *Overzicht der uitkomsten van het onderzoek der serehzieke stengels.*

Uit het verslag van de verrichte proefnemingen blijkt dus duidelijk, hoezeer in de serehzieke stengels Bact. herbicola op den voorgrond treedt.

In het geheel toch werden 182 serehzieke rietstengels onderzocht, waarbij in 179 stokken Bact. herbicola werd aangetroffen, d.i. dus in 98 % der gevallen.

Ongetwijfeld hangt dit feit ten deele samen met de omstandigheid, dat de vloeistofkulturen een samenstelling hadden, die de ontwikkeling van Bact. herbicola in het bijzonder begunstigde. Daartegenover moet gewezen worden op de talrijke gevallen, waarbij door directe uitstrijking van het perssap een rijke kultuur van Bact. herbicola werd verkregen. Intusschen werden, zij het in veel mindere mate, aangetroffen: Aërobacter aërogenes, Bac. mesentericus, Bac. subtilis, Bac. megatherium, Bac. polymyxa, Bact. fluorescens liquefaciens, Bact. prodigiosum, Bact. vulgare en verder eenige niet nader gedetermineerde gistsoorten, kaamgisten, schimmels, melkzuurbacteriën, streptococcen, sarcinen, enz.

De nevensgaande Tabel III geeft een overzicht van de frequentie der belangrijkste onder de genoemde organismen, uitgedrukt in procenten van het totaal der onderzochte rietstengels.

Tabel III.

Overzicht van de uitkomsten van het bacteriologisch onderzoek van serehzieke rietstengels.

Bact. herbicola	98 %
Aërobacter aërogenes	27,5 %
Bac. mesentericus, Bac. subtilis	21 %
Bac. megatherium	6 %
Diverse mikroben	32,5 %

De gevonden cijfers toonen dus onmiskenbaar aan, dat in tegenstelling met wat het onderzoek van het normale riet leerde, Bact. herbicola in het serehzieke riet practisch gesproken ten allen tijde werd aangetroffen. In dit verband is het nog van belang op te merken, dat Bact. herbicola geen sporevormer is, terwijl het onderzoek der blancoproeven geleerd heeft, dat eventueele infecties tijdens de bewerkingen nagenoeg steeds door sporevormende bacteriën werden veroorzaakt. Het lijdt dus geen twijfel, of Bact. herbicola is inderdaad in iederen serehzieken stengel aanwezig.

De beteekenis van dit feit zal in Hoofdstuk VIII worden besproken. Het lijkt toch aangewezen, allereerst de eigenschappen van deze mikrobe, op grond van hetgeen hieromtrent in de literatuur bekend en uit eigen onderzoek gebleken is, aan een nadere beschouwing te onderwerpen.

HOOFDSTUK VII.

De eigenschappen van bacterium herbicola Burri et Düggeli.

§ *1. Literatuuroverzicht betreffende Bacterium herbicola.*

Door Burri en Düggeli [1]) werd in 1904 een bacteriesoort beschreven, waaraan zij den naam gaven van Bacterium herbicola. Het feit, dat deze bacterie, die toch blijkens het onderzoek, door de genoemde schrijvers verricht, in de natuur zeer algemeen verspreid is, in tal van bacteriologische handboeken niet of slechts zeer terloops behandeld wordt, rechtvaardigt wel, dat hier wat uitvoeriger op de eigenschappen dezer mikrobe wordt ingegaan.

---

1) M. Düggeli. Die Bakterienflora gesunder Samen und daraus gezogener Keimpflänzchen. Centralbl. f Bakt. Abt II. Bd XII, 1904, pag. 602.

Het is zeer waarschijnlijk, dat BEIJERINCK [1]) reeds in 1888 de door BURRI en DÜGGELI uitvoerig beschreven bacterie in handen heeft gehad. BEIJERINCK toch isoleerde van het zaad van roode klaver een beweeglijke, gelatine zwak vervloeiende, bruingekleurde, diplococcus-achtige rottingsbacil, waaraan hij den naam van Bacillus agglomerans gaf. In 1906 verklaarde BEIJERINCK [2]) uitdrukkelijk, dat hij deze mikrobe identiek achtte met de inmiddels door BURRI en DÜGGELI beschreven Bact. herbicola. Zoowel uit de onderzoekingen van DÜGGELI [3]) als uit die van BEIJERINCK [4]) bleek, dat deze bacterie zeer algemeen wordt aangetroffen aan de oppervlakte van verschillende groene plantendeelen, zaden, vruchten en kiemplantjes. BEIJERINCK [5]) gaf verder een isolatiemethode aan uit het calyptraslijm van de wortelspitsen van verschillende gekiemde zaden. Volgens DÜGGELI [6]) is de mikrobe zonder twijfel identiek met de door W. WINKLER [7]) reeds eerder van pruimenbladeren geïsoleerde staafjesbacterie, waaraan deze den naam gaf van Bacillus mesentericus aureus. Deze naam moet echter ten eenenmale worden verworpen, daar hij een niet bestaande verwantschap suggereert met de bekende sporenvormende Bac. mesentericus Flügge.

Nog moet worden vermeld, dat DÜGGELI twee verschillende variëteiten van Bact. herbicola onderscheidt, waaraan hij respectievelijk den naam van Bact. herbicola aureum en Bact. herbicola rubrum geeft. Het belangrijkste verschil tusschen deze beide variëteiten is de kleur, welke voor de aureum-variëteit, zooals de naam reeds aanduidt, goudgeel, voor de rubrum-variëteit mangaanrood is.

§ 2. *Overzicht van de voor het onderzoek gebruikte stammen van Bact. herbicola.*

Daar het voor mijn onderzoek begrijpelijkerwijze van het grootste belang was, met zekerheid vast te stellen, dat de door mij ten allen tijde uit het serehzieke riet geïsoleerde en in het voorgaande hoofdstuk reeds als Bact. herbicola aangeduide organisme werkelijk identiek was met de origineele door BURRI en DÜGGELI geïsoleerde

---

[1]) M. W. BEIJERINCK. Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen. Botanische Zeitung. 1888, Bd. 46, pag. 749.

[2]) M. W. BEIJERINCK. Wundreiz, Parasitismus und Gummifluss bei den Amygdaleen. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd XV, 1906, pag. 373.

[3]) l. c. 1904, pag. 61.

[4]) l. c. 1906, pag. 372.

[5]) l. c. 1906, pag. 373.

[6]) l. c. 1904, pag. 61 en 62.

[7]) W. WINKLER. Untersuchungen über das Wesen der Bakterien und deren Einordnung im Pilzsystem. Centralbl. f. Bakt. Abt: II. Bd V, 1899, pag. 569.

bacterie, werden door mij een achttiental stammen dezer mikrobe uitvoerig op hun eigenschappen onderzocht en het resultaat van deze waarnemingen met de door Burri en Düggeli verkregen uitkomsten vergeleken.

Daarbij moet nog worden opgemerkt, dat een deel der bij het onderzoek gebruikte stammen niet afkomstig was uit serehziek, doch uit gomziek suikerriet. Er werden n.l. naast de serehzieke ook een aantal gomzieke stengels op geheel dezelfde wijze onderzocht. In al deze gevallen werd eveneens Bact. herbicola geïsoleerd en een aantal van de op deze wijze verkregen stammen zijn in het hieronder medegedeelde onderzoek opgenomen. Hieraan moet slechts worden toegevoegd, dat ik na het verschijnen van de reeds eerder geciteerde verhandeling van mej. Wilbrink over de gomziekte, haar waarnemingen heb herhaald en volledig bevestigd gevonden. Naast de eigenlijke gomziekte-bacterie werd echter door mij, evenals mej. Wilbrink dit ook aangeeft, steeds de bacterie aangetroffen, die door haar als pseudo-gomziekte-bacterie is aangeduid en welke mij bleek, identiek te zijn met Bact. herbicola.

Tabel IV.

Overzicht van de herkomst van uit suikerriet geïsoleerde stammen van Bact. herbicola.

Nummers der stammen	Geïsoleerd uit:	Herkomst van het riet.	Datum van isoleering
1	Serehziek Zwart Cheribon.	Proefstation Pasoeroean.	25 Jan. 1918
2	Serehziek Cristalina Cuba.	id.	23 Febr. 1918
3	id.	id.	23 Febr. 1918
4	Serehziek Zwart Cheribon.	id.	4 Mrt. 1918
5	Serehziek 1507 POJ.	id.	Mrt. 1918
6	Serehziek 1547 POJ.	id.	Mrt. 1918
7	Serehziek 90 F.	id.	25 Mrt. 1918
8	Gomziek 213 POJ.	Sf. Tjokrotoeloeng.	31 Aug. 1917
9	Serehziek 247 B.	Proefstation Pasoeroean.	Mrt. 1918
10	Serehziek bibitplantje 247 B	id.	16 Mrt. 1918
11	Serehziek bibitplantje Zwart Cheribon.	id.	14 Mrt. 1918
12	Serehziek 100 POJ.	id.	11 Mrt. 1918
13	Serehziek 498 F 2 c.	id.	20 Juli. 1918
14	Gomziek EK 2.	Java Bibit Mij.	17 Sept. 1918
15	Serehziek 1499 POJ.	Proefstation Pasoeroean.	4 Febr. 1919
16	Gomziek EK 2.	Sf. Pangka.	3 Mei 1919
17	id.	id.	3 Mei 1919
18	id.	Sf. Padokan.	15 Mei 1920

De herkomst van alle voor de identificatie van Bact. herbicola gebezigde stammen blijkt uit Tabel IV.

Het was niet altijd mogelijk, bij alle verschillende proefnemingen steeds dezelfde nummers te onderzoeken, daar in den langen loop van het onderzoek eenige nummers der reinkulturen door uiteenloopende oorzaken verloren gingen en dan door andere werden vervangen om het onderzoek over een voldoend aantal stammen te doen loopen. Bij alle verrichte proeven komen slechts enkele nummers doorloopend voor.

§ 3. *Morphologische kenmerken.*

a. Vorm en grootte der bacteriën.

Het mikroskopisch beeld van alle onderzochte stammen was dat van een klein staafje met afgeronde uiteinden, geheel overeenkomstig de beschrijving van Burri en Düggeli. Gewoonlijk hebben de mikroben de gedaante van dubbelstaafjes. In het protoplasma was geen structuur waar te nemen.

Voor het bepalen van lengte- en dikte-afmeting dezer mikrobe werden de eerste 12 stammen uit Tabel IV op verschillende kultuurmedia bij verschillende temperatuur gekweekt. Van dit onderzoek geeft de volgende Tabel V een overzicht. Hierin zijn de opgegeven grootste en kleinste afmetingen de gemiddelde van alle desbetreffende waarnemingen.

Tabel V.

AFMETINGEN VAN BACT. HERBICOLA ONDER VERSCHILLENDE KULTUURVOORWAARDEN.

Voedingsbodem	Temp.	Ouderdom.	Lengte van het dubbelstaafje.		Dikte van het dubbelstaafje.	
			Grootste afmeting	Kleinste afmeting	Grootste afmeting	Kleinste afmeting
Glucosepeptongelatine	20° C.	2 dagen	2.9 μ	1.8 μ	0.9 μ	0.6 μ
Glucosepeptonagar	30° C.	15 uren	3.9 μ	2.0 μ	0.6 μ	0.6 μ
Moutagar	20° C.	2 dagen	2.2 μ	0.6 μ	0.6 μ	0.6 μ

Voor de uitvoering der metingen werd het bacteriënmateriaal in water verdeeld. De maten werden afgelezen op een oculairmikrometer, die geijkt was op objectmikrometer bij een beeldafstand van 250 m.M. en een tubuslengte van 160 m.M. De meting geschiedde met objectief F en Huygensoculair 2 van C. Zeiss.

In vloeibare kulturen van Bact. herbicola bij 30° C. van 36 uren oud waren de mikroben van 2,6—3,4 μ lang en 0,6—0,8 μ dik.

Uit de verrichte metingen bleek derhalve, dat de lengte van het dubbelstaatje varieert tusschen 0,6 en 3,9 μ en de dikte tusschen 0,6 en 0,9 μ.

Hieruit volgt voor de gemiddelde lengte en dikte resp. 2,2 en 0,7; het enkel-individu is dus gemiddeld 1,1 μ lang en 0,7 μ dik.

Soms komen echter in reinkulturen van Bact. herbicola op vaste kweekbodems bacteriëndraden van omstreeks 30 μ lengte voor.

In aansluiting hierbij zij nog meegedeeld, dat alle 9 onderzochte stammen n.l. de Nos 2, 3, 8, 11, 14, 15, 16, 17 en 18 Gramnegatief bleken te zijn. Voor de kleuring volgens Gram werden bacteriën gebruikt van moutagarkulturen, die bij 30° C. gekweekt waren en na 48 uren werden onderzocht.

b. Ciliën.

Wanneer van jonge vloeistof- of plaatkulturen een kleine hoeveelheid van het bacteriënmateriaal op de gewone wijze in water gesuspendeerd onder het mikroskoop werd onderzocht, kon men daarin in den regel een sterke eigenbeweging der bacteriën waarnemen. Na eenigen tijd werd deze evenwel minder, wat ongetwijfeld met het verdwijnen van de zuurstof samenhangt. Het sterke aërobe-karakter dezer bacteriën blijkt n.l. duidelijk uit hun opeenhooping om luchtbelletjes, die toevalligerwijze in het praeparaat aanwezig waren. Dit werd nader bevestigd door, volgens de door Beijerinck aangegeven methode, een ademhalingsproef te verrichten [1]). Daarbij gedroegen de bacteriën zich volgens het aërobentype: er had n.l. een sterke opeenhooping in den meniscus van den vloeistofdruppel plaats. Voor het slagen dezer proef is het echter een vereischte, dat de gebruikte bacteriën uit zeer jonge kulturen worden genomen, daar in de oudere stadia de beweeglijkheid sterk is afgenomen.

Zooals onder *c* nader zal worden besproken, waren de onderzochte stammen gekenmerkt door een sterke slijmproduktie, die

[1]) Ueber Atmungsfiguren beweglicher Bakterien, Centralbl. f. Bakt. Abt. I, 1893, Bd. 14. pag. 827.

veelal vergezeld wordt door de vorming van typische zooglosa. Van zelf sprekend gaat hierbij de beweeglijkheid der bacteriën geheel verloren, ofschoon die in bepaalde gevallen kan terugkeeren, wanneer het omhullende slijm in water oplost.

In Tabel VI zijn een aantal waarnemingen vereenigd aangaande de kultuurvoorwaarden, waaronder de verschillende stammen al of niet beweeglijk werden bevonden.

Tabel VI.

Overzicht van de kultuurvoorwaarden, waaronder de verschillende stammen van bact. herbicola beweeglijk bleken te zijn.

Nummers der stammen.	Moutgelatine 20° C. Na 2 dagen.	Moutagar 20° C. Na 2 dagen.	Moutagar 30° C. Na 2 dagen.
No. 1	zeer beweeglijk	zeer beweeglijk	zeer beweeglijk
„ 2	beweeglijk	zeer beweeglijk	onbeweeglijk
„ 3	onbeweeglijk	onbeweeglijk	zeer beweeglijk
„ 4	zeer beweeglijk	onbeweeglijk	onbeweeglijk
„ 5	beweeglijk	zeer beweeglijk	onbeweeglijk
„ 6	beweeglijk	onbeweeglijk	onbeweeglijk
„ 7	beweeglijk	beweeglijk	onbeweeglijk
„ 8	zeer beweeglijk	onbeweeglijk	onbeweeglijk
„ 9	zeer beweeglijk	onbeweeglijk	onbeweeglijk
„ 10	onbeweeglijk	onbeweeglijk	onbeweeglijk
„ 11	zeer beweeglijk	onbeweeglijk	zeer beweeglijk
„ 12	onbeweeglijk	onbeweeglijk	onbeweeglijk

Aan deze gegevens kan nog worden toegevoegd, dat op glucose-pepton-gelatine dezelfde resultaten werden verkregen als op moutgelatine.

Uit de tabel blijkt duidelijk, hoe de beweeglijkheid een zeer onstandvastige eigenschap is, die nu eens onder deze, dan weer onder gene voorwaarden te voorschijn komt. Het moet dan ook zeer waarschijnlijk worden geacht, dat de stammen No. 10 en 12 onder nog andere kultuurvoorwaarden eveneens nog wel in beweeglijken toestand zouden zijn verkregen. Dit wordt nog gesteund door het feit, dat de voor de ciliënkleuring gebezigde stammen 1, 2, 5, 8 en 11 alle zeer beweeglijk waren na kultiveering gedurende twaalf uren op glucose-peptonagar bij 30° C., terwijl de stammen 2 en 8 onder dezelfde omstandigheden op moutagar gekweekt, geen eigenbeweging vertoonden.

Opmerkelijk is, dat gelatine-kulturen over het algemeen, wat de beweeglijkheid aangaat, gunstiger uitkomsten opleveren dan de agarkulturen. Dit toch is in strijd met de algemeene ervaringen, die bij andere bacteriën dienaangaande zijn verkregen.

Bij stam No. 8 bleek duidelijk, hoe het verlies der beweeglijkheid samenging met het optreden der slijmvorming. Aanvankelijk was namelijk een kultuur van deze bacterie op moutagar bij 20° C. goed beweeglijk; deze eigenschap ging echter omstreeks het begin van den tweeden dag verloren, toen tevens krachtige slijmvorming intrad.

Nog moet worden opgemerkt, dat de bacteriën in vele gevallen, wanneer de slijmerigheid van het mikroskopisch praeparaat niet te groot was, een duidelijke Brown'sche beweging vertoonden.

Düggeli maakt in zijn verhandeling eveneens melding van de eigenbeweging van Bact. herbicola, doch men vindt bij dezen onderzoeker geenerlei mededeeling aangaande het aantal en de groepeering der aanwezige ciliën.

Het kwam mij zeer gewenscht voor, daaromtrent eigen waarnemingen te verrichten, daar deze buiten twijfel van belang zullen zijn, indien te zijner tijd de plaats van deze alom verspreide bacterie in het systeem nader zal worden bepaald.

Door mij werden twee verschillende methoden voor ciliënkleuring toegepast.

In de eerste plaats de ciliënkleuring volgens Zettnow [1]).

Hiervoor werden de bacteriën in buisjes met schuin gestolde moutagar (of andere voedingsbodem) gekweekt. Het mikrobenmateriaal van een kultuur, die niet ouder dan 12 uren was, werd voorzichtig met een platinadraad uit het buisje genomen, zonder de agar-oppervlakte aan te raken, daar anders deeltjes van den vasten voedingsbodem naderhand mede gekleurd worden en deze het ciliënpraeparaat bederven.

Het bacteriënmateriaal werd allereerst gebracht in een druppel leidingwater op een objectglas en hierin voorzichtig met de platinadraad geroerd, om aldus de bacteriën te bevrijden van aanklevende bestanddeelen van den voedingsbodem (moutextract, glucose, pepton, enz.), daar deze eveneens reduceerend op de te gebruiken zilveroplossing werken. Deze bewerking werd eenige malen herhaald, door met een oogje in een platinadraad een weinig bacteriënsuspensie

1) W. Henneberg. Gärungsbakteriologisches Praktikum, Betriebsuntersuchungen und Pilzkunde. 1909, pag. 585.

uit den druppel in een tweeden over te brengen. De laatste druppel behoeft slechts te opaliseeren en moet zonder dekglas bekeken bij zwakke vergrooting een groot aantal krachtig beweeglijke individuen bevatten.

Met een dikke platinadraad, aan het uiteinde over eenige millimeters zwak geknikt, werden de mikroben uit den laatsten druppel op vetvrije dekglaasjes uitgestreken. Hierbij werd de platinadraad eerst naar rechts, daarna naar links bewogen, terwijl aan het einde van elke heen-en-teruggaande beweging de draad een weinig naar beneden werd verschoven. Bij het uitstrijken moet het hard drukken van de platinadraad tegen het dekglaasje voorkomen worden, daar anders de ciliën alle naar één kant—in de richting van de gemaakte streek—tegen het glas komen vast te kleven, waardoor een ciliëntelling moeilijk is te verrichten. Door deze wijze van uitstrijken wordt bereikt, dat bij de laatste streken de mikroben geheel geïsoleerd op ruimen afstand van elkander komen te liggen. Vervolgens werden het fixeeren, het bijten, het kleuren en afspoelen volgens het voorschrift uitgevoerd.

Daar Bact. herbicola op den duur veel slijm vormt, moet bij het aanleggen van de buiskultuur slechts zeer weinig van het slijmige infectiemateriaal gebruikt worden. Neemt men deze voorzorg niet, dan wordt het ciliënpraeparaat bedorven, doordat men daarin naast de jonge, beweeglijke bacteriën, gemakkelijk ook wat van het oude infectie-materiaal overbrengt.

Bij die stammen, welke zwakke slijmvorming vertoonen, kan het infectie-materiaal grooter zijn.

In de tweede plaats maakte ik gebruik van de kleuring volgens Zikes [1]).

Daar deze kleuringsmethode zeer weinig bekend is, zij hier het voorschrift in het kort weergegeven. Evenals bij de ciliënkleuringsmethode van Zettnow, worden slechts jonge bacteriënkulturen aangewend, niet ouder dan 12 uren. Ook hier geschiedt het uitstrijken der mikroben op een dekglas uit een bacteriënsuspensie in water, die slechts even opaliseert. De methode is verder als volgt:

1. Met een bajonetvormig gebogen, dikke platinadraad, waarvan het rechte uiteinde $1^1/_2$ c.M. lang is, de bacteriën met een enkele streek op het dekglas afstrijken.

[1]) H. Zikes. Über eine leicht auszuführende Geiszelfärbungsmethode nach dem Silberverfahren. Allgemeine Zeitschrift für Bierbrauerei und Malzfabrikation. Jahrgang 38, 1910.

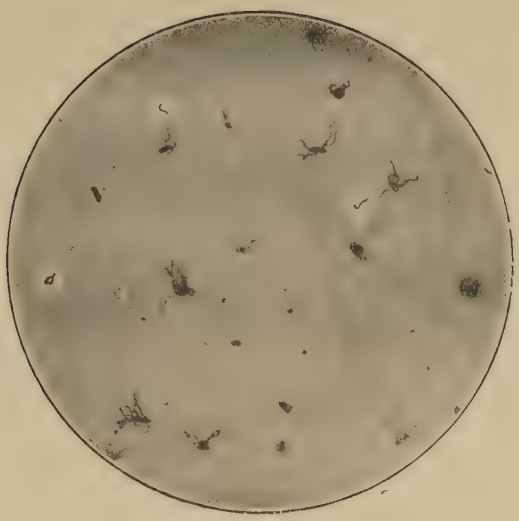

Fig. 6.

Bacterium herbicola.
Stam No. 2.
Ciliën
Lineaire vergrooting : 600 ×

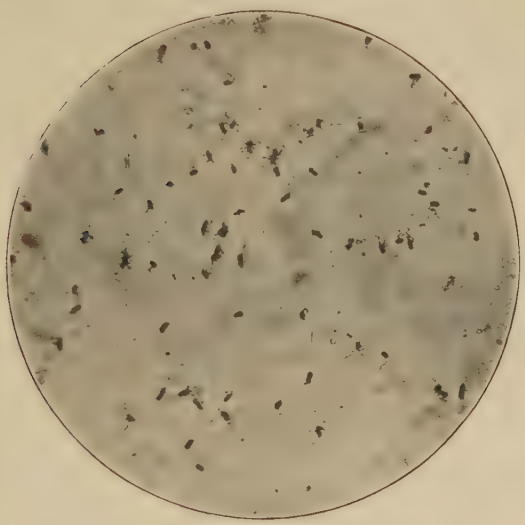

Fig. 7.

Bacterium herbicola.
Rood klaverzaad
Ciliën.
Lineaire vergrooting : 600 ×

2. Het praeparaat luchtdroog laten worden en daarna drie maal door de Bunsenvlam halen.
3. Inwerking van het bijtmiddel gedurende 1 à $1^1/_2$ minuut: daarna het praeparaat onder de waterkraan flink uitspoelen en luchtdroog laten worden.

   Het bijtmiddel bestaat uit een tannine-oplossing (2 deelen tannine + 1 deel water), waaraan eerst 5 c.c. verzadigde, oxyde-vrije ferrosulfaatoplossing druppelsgewijze wordt toegevoegd en daarna 1 c.c. geconcentreerde alkoholische fuchsine-oplossing (goed doorschudden en filtreeren).
4. Kleuren der bacteriën in twee oplossingen, die bestaan uit:
   a. een oplossing van 0,25—0,5% zilvernitraat in water.
   b. een oplossing van 5 gram galluszuur, 3 gr tannine, 10 gr. kalium-acetaat in 350 c. c. water.

Het praeparaat wordt gedurende enkele seconden in de eerste, vervolgens zonder afgespoeld te zijn, in de tweede oplossing gehouden en daarna afwisselend in de beide oplossingen gehouden, totdat lichte bruinkleuring van de bacteriënstreep optreedt.

Van de in Tabel IV genoemde 18 stammen van Bact. herbicola werden No. 1, 2, 5, 8 en 11 volgens Zettnow en No. 8 ook volgens Zikes op het aantal ciliën onderzocht. De vijf onderzochte stammen bleken maximaal 7 of 8 peritrich geplaatste ciliën te bezitten, die 2 à 4-maal zoo lang zijn als het enkele staafje. Bij het doorzoeken der ciliënpraeparaten treft men soms dubbelstaafjes aan, die door een kapseltje zijn omgeven, waaruit de ciliën ontspringen.

Fig. 6 is een ciliënphotogram van stam No. 2 van Bact. herbicola. Op de geteekende fig. 8 zijn de verschillende belangrijkste typen van ciliëngroepeering bijeengebracht, daar deze moeilijk in één mikrophotogram te vereenigen waren.

In October 1917 werd mikrobe No. 8 in reinkultuur aan Erwin F. Smith te Washington verzonden. In een schrijven van April 1918 berichtte Smith mij „I find the organism which you sent is motile by means of five to seven peritrichiate flagella."

Ter nadere bevestiging van de identiteit der door mij geïsoleerde stammen met Bacterium herbicola van de in Europa werkzame onderzoekers, kwam het mij zeer gewenscht voor, bij een volgens de aanwijzing van deze onderzoekers geïsoleerden stam eveneens het aantal en de gedaante der ciliën vast te stellen. Dit onderzoek werd door mij in 1921 in het Laboratorium voor Mikrobiologie der Technische Hoogeschool te Delft verricht bij een stam, dien ik van de

oppervlakte van rood klaverzaad isoleerde. Fig. 7 geeft een mikrophotogram van een volgens de methode van ZETTNOW vervaardigde ciliënkleuring weer. Duidelijk blijkt hieruit, hoe het aantal, de groepeering en de afmetingen der ciliën bij deze authentieke Bact. herbicola in groote trekken geheel overeenkomen met die van den uit het suikerriet geïsoleerden stam No. 2. Fig. 9 geeft wederom een overzicht van de verschillende typen van ciliëngroepeering, zooals die in het praeparaat van den van klaverzaad geïsoleerden stam werden aangetroffen.

c. Vorming van zoogloea.

Een der meest typeerende eigenschappen van Bact. herbicola is de vorming van eigenaardige slijmklompjes of zoogloea, zoowel in vloeibare als op vaste voedingsmedia. Deze zoogloea vertoonen, zooals DÜGGELI [1]) terecht opmerkt, veel gelijkenis met worstjes. De vorm en de grootte der zoogloea loopen zeer uiteen; veel voorkomende vormen zijn langwerpig en ovaal, rond of gedrongen, al of niet geplooid en in langere of kortere reeksen onderling verbonden. In de granulatie van deze scherp begrensde slijmklompjes kunnen somtijds de afzonderlijke mikroben herkend worden, die door de slijmvorming hare beweeglijkheid hebben verloren.

Bij mikroskopische beschouwing van een zoogloea-praeparaat in water onder dekglas, bemerkt men dikwijls, dat de bacteriënklompjes omgeven zijn door een heldere, mikrobenvrije zône, die weer begrensd is door een bacteriënveld. Door stroomingen, die hierin voorkomen, — wanneer het praeparaat na het opleggen van het dekglas nog niet geheel tot rust is gekomen — merkt men, dat de beweginglooze mikroben in taaie vloeistof met den stroom worden meegenomen en zich volgens de stroomlijnen rangschikken in den vorm van slieren. Men ziet, dat de heldere massa om de worstjes langzamerhand verdwijnt in de aangrenzende vloeistof, die blijkbaar bestaat uit een oplossing van slijm in water, waarin de hyaline-slijmlaag oplost. Eindelijk komt het slijm der worstjes aan de beurt om in het toetredende water op te lossen, waarbij zij geheel uiteenvallen en de bacteriën vrijkomen.

Is de waterige slijmmassa niet te taai, dan kan men waarnemen, dat de mikroben hare beweeglijkheid hierbij herkrijgen en zij in grooten getale uitzwermen op de plaats, waar het water het zoo-

[1]) l. c. 1904, pag. 63.

Fig. 8.

Bacterium herbicola.
Stam No. 2.
Ciliën.
Lineaire vergrooting: 600 ×
(Penteekening).

Fig. 9.

Bacterium herbicola.
Rood klaverzaad.
Ciliën.
Lineaire vergrooting: 600 ×
(Penteekening).

gloeaslijm heeft opgelost. Dit proces werd reeds door Düggeli [1]) als volgt kenschetsend beschreven:

„Kürzere oder längere Zeit liegen die „Würstchen" scheinbar nicht beëinfluszt im Wasser, hier und da ist eine Volumvergröszerung der Zooglöe, hervorgerufen durch Wasseraufname und deshalb erfolgte Verquellung des Bakterienschleimes zu konstatieren, meist aber bleibt die Zooglöe scheinbar unverändert liegen. Plötzlich regt sich im Innern ein Stäbchen, ein zweites, ein drittes folgt und bald ist im Innern ein heller Aufruhr ausgebrochen. Die Bakterien bewegen sich mit einer solchen Geschwindigkeit durcheinander, dasz das Auge sie nicht zu folgen vermag. Der Inhalt der Zooglöe scheint förmlich zu kochen. Auf einmal entsteht irgendwo, bald an einem Ende, bald auf der Seite ein Risz und die sich lebhaft bewegenden Stäbchen strömen mit grószter Geschwindigkeit durch die entstandene Bresche aus. Allmählich wird das Ausströmen langsamer und jedes Bakterium kann einzeln beim Ablösungsprozesz verfolgt werden."

Hoewel men de door Düggeli beschreven verschijnselen onder het mikroskoop dikwijls kan waarnemen, zijn de gevallen, waarbij de slijmklompjes langzaam in een onbeweeglijke bacteriënmassa uiteenvallen, veel talrijker.

De vorming van zoogloea wordt vooral in vloeistofkulturen aangetroffen. Zij kan daarin onder bepaalde omstandigheden zoo sterk zijn, dat er een taaie slijmerige huid gevormd wordt, die met een platinadraad als een samenhangende massa uit de vloeistof is te lichten. Ook op gelatineplaatkulturen werd veelvuldig vorming van zoogloea waargenomen. Daarentegen treedt zoogloea-vorming op agarplaatkulturen slechts zelden op. Wel heeft op glucose-pepton- en moutagar dikwijls rijkelijk slijmvorming plaats, doch hierin werden de typische klompjes slechts zelden aangetroffen.

Bij de in het vorige hoofdstuk beschreven kultuurproeven van de organismen uit het serehzieke riet, kon in vele gevallen gebruik worden gemaakt van de typische zoogloea-vorming, ter herkenning van Bact. herbicola [2]).

[1]) l. c. 1904, pag. 187.

[2]) Indien deze zoogloea klein blijven, ovaal van vorm zijn en fijn gegranuleerd. vertoonen zij dikwijls een oppervlakkige gelijkenis met somtijds eveneens in de kulturen tot ontwikkeling komende gisten, zoodat, wanneer men hierop niet bedacht is, deze laatste voor bacteriënzoogloea zouden kunnen worden aangezien. Toevoeging van wat joodjoodkalium-oplossing heeft echter ten gevolge, dat de granuleering der bacteriënklompjes duidelijker wordt, waardoor ook in twijfelachtige gevallen het onderscheid met de gistcellen gemakkelijk is waar te nemen.

Toch moet opgemerkt worden, dat in sommige gevallen de zoogloea niet optraden.

Zoogloea kunnen bij eenzelfden stam van Bact. herbicola nu eens voorkomen, dan weer afwezig zijn, hetgeen o.a. bij het volgende geval bleek. Met het sap van een zwaar serehzieke EK 2-plant van bijna 3 maanden oud werd op de gewone wijze een kultuurproef aangelegd. Na verloop van eenige dagen konden in de mikrobenmassa der proefbuis geen zoogloea gevonden worden. Een uitstrijking der gekweekte mikroben op moutgelatine gaf na 3 dagen een reinkultuur van Bact. herbicola, die alle eigenschappen dezer mikrobe op de plaat te zien gaf en evenzoo de zoogloea, welke bij de kultuurproef ontbraken. De zoogloea-vorming is dus geen vast kenmerk van deze mikrobensoort.

Ook het omgekeerde geval deed zich voor. Uit een serehzieken EK2-stok van verscheidene maanden oud, werden de mikroben in een vloeistofkultuur gekweekt. Na een dag reeds bestond deze kultuur uit louter zoogloea. Hiervan werd een koloniënkultuur gemaakt op moutgelatine, waarbij in de reine koloniën van Bact. herbicola de zoogloea slechts schaars te vinden waren, dus geheel in tegenstelling met de aanvankelijke buiskultuur. Ook naderhand werden ze niet talrijker. Daarbij waren de zoogloea op de plaat fijner van granulatie, terwijl die van de buiskultuur een grofkorrelig uiterlijk hadden.

Zoowel het uiterlijk der zoogloea als het vermogen om deze te vormen, kunnen bij eenzelfden stam fluctueeren en zijn waarschijnlijk afhankelijk van kleine, niet gemakkelijk aan te geven verschillen in kultuuromstandigheden.

Zooals uit deze beschrijving der door mij waargenomen verschijnselen blijkt, waren de door mij geïsoleerde bacteriën zeer variabel, hetgeen geheel in overeenstemming is met hetgeen door Beijerinck[1]) aangaande den rijkdom aan vormen bij Bact. herbicola wordt aangegeven.

d. Ontbreken van het vermogen tot sporenvorming.

Onder geen omstandigheid werd bij mikroskopisch onderzoek de vorming van sporen waargenomen, terwijl Bact. herbicola, ook in oudere kulturen, geen pasteurisatie (10 minuten bij 60° C.) doorstaat. Ook Düggeli [2]) kon geen sporen aantoonen.

1) M. W. Beijerinck. Verzamelde geschriften. Mutabilität bei Bacillus herbicola. Dl 5, pag. 53.
2) l.c. 1904 pag. 63.

§ 4. *Beschrijving van de op vaste voedingsbodems verkregen bacteriënkoloniën.*

a. Vorm, kleur en aard der koloniën op gelatineplaten.

Een uitzaaïing of uitstrijking van een verdunde suspensie der onderzochte stammen op mout-, glucose-pepton- of rietsapgelatine bij 20° C. gaf reeds na ongeveer 2 dagen, soms veel eerder, bleeke, kleine, ronde koloniën te zien, die snel in uitgebreidheid toenamen en daarbij in den regel zeer vlak bleven. Gewoonlijk ging de ronde gedaante der koloniën vrij gauw verloren en verkregen deze een bochtigen of zeer onregelmatig gelobden rand. Zeldzamer kwam het voor, dat uitloopers gevormd werden, die eenigszins verbreed uitliepen.

Indien niet te spoedig vervloeïing intrad, konden, zoowel bij de ronde als bij de bochtig gerande koloniën fraaie en verschillende oppervlakte-structuren gevormd worden, zooals enkele, dubbele en meervoudige rosetten met een hart in het midden: stralende figuren in eenige concentrische zônes: grillige netachtige teekeningen, enz. Ook kwam het voor, dat de koloniën een opstaanden rand kregen en in het midden een weinig verzonken. Bleven de koloniën een glad oppervlak behouden, dan waren dikwijls concentrische ringen waar te nemen, met zwakke koepelvormige welving. Andere koloniën waren sterk geplooid of bestonden uit mikroskopische zoogloea, waarbij de kronkelingen dikwijls willekeurig dooreen lagen. Weer andere koloniën bezaten geen bijzondere structuur en zagen er fijn of grof gegranuleerd uit.

De consistentie der koloniën was zeer uiteenloopend en van een boterachtige zachtheid tot een brokkelige hardheid. Slijmvorming trad eerst bij het ouder worden der koloniën op. Sterk samenhangende en harde koloniën konden met een platinadraad geheel uit de gelatine gelicht worden.

Aanvankelijk waren de koloniën, die op de plaat opkwamen, zwak troebel, doorschijnend en soms zwak iriseerend. Na ongeveer 2 dagen bezaten ze een doorsnede van ongeveer 1 m. M., een afmeting, die echter bij de verschillende stammen van Bact. herbicola zeer veranderlijk is. Op mout- en glucosegistwatergelatine werden de opgroeiende koloniën langzamerhand zwak geel en ten slotte goudgeel, okerkleurig of helder geelbruin. Op vleeschgelatine verschenen na omstreeks 30 uren kleine, troebelwitte, nauwelijks zichtbare puntjes. Na 2 dagen waren ze uitgegroeid tot ronde koloniën van ongeveer $^1/_2$ m.M. diameter. Ze waren bij opvallend licht bleek grijsgeel van

kleur, bij doorvallend licht bleek blauw en zwak iriseerend. Langzamerhand werden de koloniën nu geel, terwijl de ronde vorm een niet geheel gaven rand bezat. Waren ze 5 à 6 dagen oud geworden, dan was de diameter $1^1/_2$ à 2 m.M. geworden en de kleur helgeel.

Ook blijvend witte koloniën kwamen voor, doch deze werden bij het onderzoek zelden aangetroffen. Werd in de gelatineplaten naast glucose, pepton Carne aangewend, dan hadden de koloniën dezelfde kleur als op moutgelatineplaten. Bij gebruik van pepton Witte daarentegen werd het gele pigment spaarzamer gevormd of bleef geheel weg, zoodat de koloniën bleek van uiterlijk waren.

Ook bij eenzelfde reinkultuur kon men soms waarnemen, dat de koloniën onderling in vorm en oppervlakte-structuur opmerkelijke verschillen vertoonden; zoo werden de rosetvormige koloniën vooral nabij den hollen gelatinerand aan den omtrek van de kultuurdoos aangetroffen, waar de uitdroging van de plaat het sterkst was.

Uit de hierboven gegeven beschrijving van het uiterlijk der koloniën gedurende de eerste dagen der ontwikkeling blijkt ook weer de zeer groote variabiliteit, die deze mikrobe eigen is, iets, waarop, zooals we reeds zagen, ook door Beijerinck reeds gewezen is.

b. Het vervloeien der gelatineplaten.

Gewoonlijk na omstreeks 6 dagen, dikwijls echter ook vroeger of later, kon men bij een koloniënkultuur eerst een week worden en daarna een vervloeien van gelatine waarnemen op de plaats der koloniën. Deze veranderden daarbij in een weeke massa, doortrokken van een warnet van gele slijmdraden. Radiaire structuurelementen der koloniën gingen in sommige gevallen over in straalsgewijze geplaatste gele slijmdraden, die den scherp begrensden, niet vervloeiden omtrek verbonden met het vervloeiende centrum.

Het slijm, in de koloniën gevormd, was al of niet dradentrekkend. Soms gelukte het zelfs om met behulp van een platinadraad slijmdraden van omtreeks 25 c. M. te trekken. Indien men bij vervloeide koloniën op gelatine sterke slijmdraden kon trekken, kwam het soms voor dat de geheele kolonie als een slijmdraad uit de holte in de gelatine gelicht kon worden.

Ook kwam het voor, dat de vervloeïing zich een halven centimeter en meer uitstrekte buiten den omtrek der koloniën. Ronde koloniën, die geheel vervloeid waren, lagen verzonken in een scherp begrensde holte met hollen vloeistofmeniscus. In Tabel VII zijn een aantal waarnemingen samengevat van den tijdsduur, na afloop waar-

van een vervloeïing van de gelatine rondom de koloniën voor het eerst zichtbaar werd.

TABEL VII.

OVERZICHT VAN HET VERMOGEN TOT VERVLOEÏING VAN GELATINE DOOR VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BACT. HERBICOLA.

Numers der stammen.	Al of niet gelatinevervloeiend. [1]	Tijd, waarna de gelatinevervloeïing duidelijk was ingetreden.
No. 1	—	
2	+	8 dagen
3	—	
4	+	6 »
5	+	6 »
6	+	6 »
7	+ (verweeken)	5 »
8	+	6 »
9	+	6 »
10	+ (zwak vervloeiend)	4 »
11	+	9 »
12	—	
13	+	3 »
14	+	4 »
15	+	7 »
16	+	4 »
17	+	8 »
18	+	3 »

Was eenmaal de vervloeïing van de gelatine ingetreden, dan kon men waarnemen, dat de snelheid en intensiteit hiervan voor de verschillende stammen van Bact. herbicola nogal uiteenliepen. De vervloeïing kon krachtig, matig of zwak zijn. Ook het verweeken der gelatine, zonder tot vervloeïing over te gaan, kwam voor, terwijl eenige keeren noch verweeken, noch vervloeien kon worden waargenomen.

In het algemeen genomen trad voor eenzelfde reinkultuur de gelatinevervloeïing niet gelijktijdig voor alle koloniën in, doch ging deze, eenmaal aangevangen, gestadig verder, totdat de geheele gelatineplaat vervloeid was.

DÜGGELI deelt in zijn beschrijving van Bact. herbicola mede, dat hij noch voor zijn aureumvorm, noch voor zijn rubrumvorm ooit met zekerheid een vervloeïing van de gelatine kon constateeren. Intusschen kon hij wel een „Erweichen" der gelatine vaststellen, terwijl hij bij de beschrijving van de gelatine-steekkultuur zegt: „Die Gelatine sinkt bei der langsamen Verflüssigung allmäh-

[1]) De negatieve waarnemingen zijn verricht na een tijdsduur van 8 dagen.

lich ein, so dasz die oberflächliche Auflagerung schlieszlich in den Grund einer napfförmigen, mit Luft gefüllten Vertiefung zu liegen kommt. Die Gelatine wird in Berührung mit der Bakterienmasse erweicht, nicht aberverflüssigt."

In hoeverre een scherpe onderscheiding tusschen een vervloeien en een weekworden gerechtvaardigd is, kan in het midden gelaten worden. Op grond van het boven aangehaalde leek het mij niet noodig om uit het feit, dat verschillende der door mij geïsoleerde stammen de gelatine onmiskenbaar vervloeiden, tot de niet-identiteit dier bacteriën met Bact. herbicola Düggeli te besluiten.

En dit te meer, daar ook Beijerinck [1]) melding maakt van het feit, dat ook de door hem geïsoleerde stam van Bact. herbicola de gelatine vervloeit, waaraan kan worden toegevoegd, dat ook door mij in enkele gevallen niet-vervloeiende stammen werden geïsoleerd, die overigens geheel met de wel vervloeiende stammen overeenstemden.

c. Vorm, kleur en aard der koloniën op agarplaten.

Deze leverde niet zooveel kenmerkende eigenschappen op als de kultuur op gelatineplaten. Op beide platen waren aanvankelijk de opgroeiende koloniën in uiterlijk aan elkander gelijk. Regelmatige koloniënstructuren komen op agarplaten evenwel slechts weinig voor. Onregelmatige en sterk geplooide koloniën kwamen op beide kultuurplaten voor. Meestal waren koloniën op agar vlak, slijmerig en glad. Daar de kweektemperatuur voor agarkulturen omstreeks 30° C. was, dus een tiental graden hooger dan voor gelatine, ontwikkelden de koloniën zich sneller. De kleur is ook op agarplaten goudgeel tot bruingeel.

Nog werd nagegaan, in hoeverre het op de agarplaten gevormde bacteriënslijm de cellulose-reactie gaf, zooals dit bij Acetobacter xylinum Brown het geval is. Hiertoe werd het gele slijm op een objectglas uitgestreken en bij zachte verwarming ingedroogd, waarbij het geheel fraai doorzichtig werd. Behandeling van het ingedroogde slijm met chloorzinkjood of met geconcentreerd zwavelzuur en jodium gaf evenwel geen blauwkleuring.

Beijerinck [2]) vermeldt, dat het slijm van Bact. herbicola niet voor boterzuurgisting vatbaar is. Overeenkomstig de door hem gegeven indeeling der bacteriënwandstoffen [3]) moet het slijm gerekend

[1]) M. W. Beijerinck. Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen. Verzamelde geschriften. Dl 2, pag. 167.
[2]) M.W. Beijerinck. Mutation bei Mikroben. Verzamelde geschriften Dl 5, pag. 53.
[3]) l. c. pag. 90.

worden tot de cellulanslijnen, welke gekenmerkt zijn door het feit, dat zij uit uiteenloopende suikers gevormd kunnen worden, terwijl de cellulose-reactie negatief is. [1]).

§ 5. *Optimumtemperatuur van de ontwikkeling.*

De bepaling der optimumtemperatuur van de ontwikkeling geschiedde voor 8 verschillende stammen op de volgende wijze. Reinkultuursuspensies der mikroben in steriel leidingwater werden gebruikt om vergelijkbare kulturen aan te leggen.

Een platina draad-oogje van de suspensie werd telkenmale afgestreken op schuingestolde moutagarbuisjes.

Voor kweektemperaturen werden gekozen: 20° C., 30° C., 34° C., 37° C. en 41° C., zoodat voor elk der 8 mikrobenstammen 5 moutagarbuizen noodig waren. Na het enten werden de 5 seriën van 8 buizen gelijktijdig aan de genoemde temperaturen blootgesteld.

Tabel VIII geeft een overzicht van het resultaat der proef.

Hieruit blijkt, dat voor de verschillende stammen de optimumtemperatuur uiteenloopt. Er werd gevonden voor:

5 stammen een opt. temperatuur van 34° C.
2 » » » » 30° C.
1 stam » » » 37° C.

Geen der onderzochte mikroben had een opt. temperatuur van 20 of 41° C., terwijl bij deze laatste temperatuur nog slechts in een enkel geval groei optrad.

§ 6. *De stofwisseling.*

a. De behoefte aan vrije zuurstof.

Alle onderzochte stammen bleken streng aëroob te zijn. In zeer gevariëerde kultuurmedia bleek bij afsluiting van zuurstof geen ontwikkeling plaats te grijpen. Dit resultaat is geheel in overeenstemming met de in § 3 onder *b* beschreven ademhalingsproef volgens Beijerinck. In de energetische behoefte der cellen kan dus uitsluitend door oxydatie-processen met vrije zuurstof worden voorzien.

b. Ontbreken van het vermogen tot vergisting van suikers.

Zooals op grond van het voorgaande te verwachten was, bleken alle 18 onderzochte stammen niet in staat suikers onder gasvorming te ontleden. Het desbetreffende onderzoek geschiedde door de verschillende stammen te enten in reageerbuizen, waarin suiker-

[1]) l. c. pag. 104.

Tabel VIII.

Overzicht van het temperatuur-optimum voor de ontwikkeling van verschillende stammen van bact. herbicola.

Nummers der stammen.	Temperatuur.	Groeitijd	Mate van groei.	Opmerkingen	Optim. temp.
No. 2	20° C.	16 uren	—	Begin v. groei na ± 48 u.	
	30° C.	16 »	begin		
	34° C.	16 »	*vrij goed*		34° C.
	37° C.	16 »	matig		
	41° C.	16 »	—	Na 48 u. nog geen groei.	
No. 3	20° C.	24 »	—	Begin v. groei na 48 uur.	
	30° C.	24 »	matig		
	34° C.	24 »	*goed*		34° C.
	37° C.	24 »	begin		
	41° C.	24 »	—	Na 48 u. nog geen groei.	
No. 11	20° C.	38 »	—	Na 48 u. nog geen groei.	
	30° C.	38 »	vrij goed		
	34° C.	38 »	*goed*		34° C.
	37° C.	38 »	matig		
	41° C.	38 »	—	Na 48 u. nog geen groei.	
No. 16	20° C.	16 »	—	Begin v. groei na ± 38 u.	
	30° C.	16 »	vrij goed		
	34° C.	16 »	*goed*		34° C.
	37° C.	16 »	begin		
	41° C.	16 »	—	Na 48 u. nog geen groei.	
No. 18	20° C.	16 »	—	Begin v. groei na 38 uur.	
	30° C.	16 »	*krachtig*		30° C.
	34° C.	16 »	vrij goed		
	37° C.	16 »	begin		
	41° C.	16 »	—	Begin v. groei na ± 48 u.	
Uit gomziek	20° C.	38 »	—	Begin v. groei na 48 uur.	
EK 2 Proefst.	30° C.	38 »	*goed*		30° C.
Pasoeroean	34° C.	38 »	matig		
22 Juli '20	37° C.	38 »	—	Na 48 u. nog geen groei.	
	41° C.	38 »	—	Na 48 u. nog geen groei.	
Uit serehziek	20° C.	16 »	—	Begin v. groei na ± 48 u.	
EK 28 van de	30° C.	16 »	vrij goed		
Sf. de Maas	34° C.	16 »	*goed*		34° C.
28 Juli '20	37° C.	16 »	begin		
	41° C.	16 »	—	Na 48 u. nog geen groei.	
Uit gomziek	20° C.	16 »	—	Begin v. groei na 38 uur.	
SW 3 Proef-	30° C.	16 »	begin		
station	34° C.	16 »	matig		
Pasoeroean	37° C.	16 »	*goed*		37° C.
28 Juli '20	41° C.	16 »	—	Na 48 u. nog geen groei.	

houdende kultuurvloeistoffen waren gebracht. Als zoodanig deden dienst moutextract, glucose-pepton-oplossing van de gebruikelijke samenstelling en eveneens gistwater, waarin de suikers (glucose en saccharose) tot een bedrag van 2 à 4% waren opgelost. De reageerbuizen waren ingericht als z.g. Durhambuisjes, [1]) door in de vloeistof kleine, met het gesloten einde naar boven gekeerde buisjes te brengen. Bij het steriliseeren vullen de kleine buisjes zich geheel met de kultuurvloeistof. Wanneer de te onderzoeken bacterie hierin gas vormt, wordt een deel hiervan in de kleine buisjes opgevangen. Zooals reeds opgemerkt werd, waren in dit opzicht alle uitkomsten negatief.

c. Zuurvorming uit suikers bij aërobe kultuur.

Het aantoonen der zuurvorming uit suikers (glucose, rietsuiker) kon niet op gelatineplaten geschieden, daar deze door de tryptische werking vervloeit. Agarplaten waren hier dus aangewezen.

De zuurvorming uit glucose werd voor de ondergenoemde 17 mikrobenstammen onderzocht op glucose-pepton-agarplaten, die met lakmoes donkerblauw gekleurd waren. Hierop werden bacteriënstrepen getrokken van ongeveer 6 c.M. lengte en 1 c.M. breedte. Tabel IX geeft het resultaat der proef na 3 dagen groei bij 30° C.

TABEL IX.

OVERZICHT VAN HET VERMOGEN TOT ZUURVORMING UIT GLUCOSE VAN VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BACT. HERBICOLA.

Nummers der stammen.	Groei na 3 dagen.	Mate van zuurvorming.
No. 1	zwak	zwak
2	krachtig	krachtig
3	krachtig	zwak
4	zwak	zwak
5	krachtig	zwak
6	krachtig	zwak
7	krachtig	zwak
8	krachtig	zwak
9	krachtig	zwak
10	krachtig	krachtig
11	krachtig	zwak
12	zwak	zwak
14	krachtig	goed
15	krachtig	matig
16	krachtig	krachtig
17	krachtig	krachtig

[1]) Men zie hiervoor: JOHN PERCIVAL. Agricultural Bacteriology. London, 1920, pag. 63.

Bij de zwakke zuurvorming was het roode veld gewoonlijk niet veel grooter dan de getrokken bacteriënstreep. Anders is dit het geval bij sterke zuurvorming, b.v. bij stam No. 2, waarvan de grootste diameter van het roode, ovale diffusieveld 6 c. M. was, met een kleinsten diameter van $2^1/_2$ c.M. Langzamerhand verbleekte de roode kleur van het veld blijkbaar door de vorming van ammoniak uit de aanwezige organische stikstofverbindingen, waardoor de oorspronkelijke blauwe kleur van de plaat geleidelijk terugkeerde en zelfs plaatselijk sterker werd. In 24 dagen was de roode kleur nagenoeg geheel verdwenen. Ook bij de zwakke zuurvorming ging ten slotte na korteren of langeren tijd de roode kleur van lakmoes bij zuurvorming over in de oorspronkelijke blauwe kleur.

Door Beijerinck is gewezen op een eigenaardigheid, die alle zuurvormende mikroben vertoonen, als men die brengt op vaste, suiker-pepton-houdende voedingsbodems.

Onder den invloed van het gevormde zuur slaan de in de handelspepton (althans in pepton Witte) steeds aanwezige albumosen neer, waardoor zich rondom de koloniën een wit ondoorschijnend veld vormt.

Bact. herbicola vormt op glucose-pepton-agar een fraai wit albumose-neerslag. Van de onderzochte stammen, Nos. 2, 3, 11, 14, 15, 16, 17 en 18 werden, op No. 11 na, door alle duidelijke albumose-velden gevormd, die na 2 dagen groei bij 30° C. gemiddeld 6 c M. grootsten en $2^1/_2$ c.M. kleinsten diameter hadden bij een bacteriënstreep van 4 c.M. lang en 1 c.M. breed.

De zuurvorming uit rietsuiker werd voor 8 mikrobenstammen onderzocht op een rietsuikergist-agarplaat van de volgende samenstelling:

Gistwater	100	c.c.
Agar	2	G.
Rietsuiker (Merck)	2	G.
Asparagine	0,1	G.
K_2HPO_4	0,05	G.

Blauw lakmoes toegevoegd tot helderblauwe kleur.

Het gistwater werd verkregen door 50 G. droge gist met 1 Liter leidingwater te extraheeren.

Op deze plaat werden de mikroben afgestreken als strepen van 2 à 3 c.M. lang en 1 c.M. breed. Het resultaat der proef, na een groeitijd van 2 dagen bij 30° C., is aangegeven in nevensgaande Tabel X.

Tabel X.

Overzicht van het vermogen tot zuurvorming uit rietsuiker van verschillende stammen van bact. herbicola.

Nummers der stammen.	Groei na 2 dagen.	Mate van zuurvorming.
No. 2	krachtig	goed
3	krachtig	zwak
11	krachtig	zwak
14	krachtig	matig
15	krachtig	goed
16	krachtig	goed
17	krachtig	goed
18	krachtig	matig

Bij de goed zuurvormende mikrobenstammen werd reeds na 3 dagen een duidelijke diffusiezoom om de bacteriënstrepen van $^1/_4$ tot $^1/_2$ c.M. breedte gevormd.

d. Ammoniakvorming uit eiwitachtige stoffen.

Door de onderzochte bacteriën wordt bij aërobe kultuur op vaste voedingsbodems uit de aanwezige eiwitachtige lichamen (hetzij direct uit de eiwitten, hetzij uit de daaruit gevormde peptonen) ammoniak afgesplitst, dat in de eerste plaats tot uiting komt in het ontstaan van een alkalische reactie van het kultuurmedium. Dit verschijnsel komt het duidelijkst tot uiting bij kultuur in afwezigheid van suikers, daar anders het uit deze gevormde zuur aanvankelijk neutraliseerend zou werken.

Gebruikt men evenwel een koolhydraatvrij medium, zooals b.v. vleeschagar, dan is het ontstaan eener alkalische reactie na korten tijd gemakkelijk aan te toonen, waarbij ik als volgt te werk ging. Aan de nog vloeibare vleeschagar werd een weinig van een blauwe lakmoesoplossing toegevoegd en daarna druppelsgewijze zooveel verdund zoutzuur, dat de omslag in rood juist plaats had. Op de hieruit verkregen roode lakmoesplaten werden acht stammen afgestreken.

Na ruim 1 dag bij 30° C. vertoonden zich om de bacteriën strepen, die zich in dezen tijd krachtig ontwikkeld hadden, helder blauwe velden met gemiddeld $3^3/_4$ c.M. grootste en 2 c.M. kleinste afmeting, bij een bacteriënstreep van $2^1/_2$ c.M. lang en ongeveer 1 c.M. breed. Reeds na den 3en dag was de geheele roode kleur in blauw veranderd.

Dat de gevormde alkali inderdaad ammoniak was, bleek uit het ontstaan van de typische kristallen van ammoniummagnesiumphosphaat in de vleeschagarplaten.

e. Vorming van indol in bouillonkulturen.

Een achttal stammen werden in vleeschbouillon bij 30° C. gekultiveerd, waarin goede ontwikkeling plaats had. Na 4 dagen werd nagegaan met behulp van de reactie van Kitasato-Salkowsky, in hoeverre in de kultuurvloeistoffen indol aanwezig was. Daartoe werden deze in de eerste plaats vermengd met een zeer verdunde oplossing van kaliumnitriet (0,01%) en daarna voorzichtig zwavelzuur (1 deel gec. zwavelzuur met 3 deelen gedistilleerd water) toegevoegd. Is indol aanwezig, dan verschijnt op het grensvlak der beide vloeistoffen een rose of roode ring. De beoordeeling geschiedde na 5 minuten. Een later optredende verkleuring is als een negatieve uitkomst beschouwd.

Het resultaat van de onderzochte stammen is in Tabel XI samengevat.

Tabel XI.

Overzicht van het vermogen tot indolvorming van verschillende stammen van bact. herbicola.

Nummers der stammen.	Groei na 4 dagen.	Mate der indolvorming.
No. 2	goed	zwak
3	goed	geen
11	goed	geen
14	goed	geen
15	goed	matig
16	goed	geen
17	goed	geen
18	goed	krachtig

f. Het reduceerend vermogen.

Zooals bekend, zijn de meest uiteenloopende mikrobensoorten gekenmerkt door haar vermogen tot reductie van verschillende, zoowel organische als anorganische stoffen. Daarbij is gebleken, dat in tegenstelling met hetgeen men zou kunnen verwachten, ook streng aërobe organismen in vele gevallen een reduceerend vermogen bezitten [1]). Bij deze onderzoekingen is nog aan het licht getreden, dat

[1]) Friedr. Muller. Über reduzierende Eigenschaften von Bacterien. Centralbl. f. Bakt. 1e Abt. Bd. 26, 1899, pag. 5; Über das Reduktionsvermogen der Bacterien. Ibid 1899, pag. 801.

van een reeks reduceerbare verbindingen door verschillende organismen volstrekt niet altijd eenzelfde verbinding het gemakkelijkst wordt gereduceerd. Naast een algemeene reduceerende is dus een voor ieder der organismen specifieke werking vast te stellen.

Op grond van een en ander was het dus aangewezen, na te gaan in hoeverre de in het onderzoek opgenomen stammen van Bact. herbicola in staat waren een aantal uiteenloopende verbindingen te reduceeren. Hierbij werd speciaal aandacht geschonken aan de door Beijerinck aangegeven reductie-reacties [1]).

1e. *Zwavelwaterstofvorming uit pepton.*

Om na te gaan of uit pepton zwavelwaterstof wordt gevormd, werden acht stammen afgestreken op platen van de volgende samenstelling:

Leidingwater	100	c.c.
Agar	2	G.
Glucose	2	»
Pepton Witte	1	»
K_2HPO_4	0,05	»
$PbCO_3$	1	» (overmaat)

Door de toevoeging van loodcarbonaat vormt zich met zwavelwaterstof het bruine tot zwarte loodsulfide.

Tabel XII geeft een overzicht van het resultaat der proef na 11 dagen bij 30° C.

Tabel XII.

Overzicht van het vermogen tot zwavelwaterstofvorming uit pepton van verschillende stammen van Bact. herbicola.

Nummers der stammen.	Groei na 11 dagen.	Mate van zwavelwaterstofvorming.
No. 2	goed	matig
3	goed	nihil
11	matig	zwak
14	matig	matig
15	krachtig	matig
16	krachtig	matig
17	krachtig	matig
18	goed	matig

1) M. W. Beijerinck. Phénomènes de réduction products par les microbes. Verzamelde geschriften Dl IV, pag. 192.

De onderzochte stammen vormen, op No. 3 na, een zwakke of matige hoeveelheid zwavelwaterstof. De kleur van het gevormde loodsulfide was bruin of bruinzwart.

2e. *Sulfide-vorming uit natriumthiosulfaat.*

Bij gebruik van natriumthiosulfaat wordt, indien reductie plaats heeft, hieruit door zuurstofonttrekking sulfide of polysulfide gevormd. De beoordeeling van de intensiteit der sulfide-vorming geschiedt evenals boven, naar de bruine of zwarte kleur van het loodsulfide, uit toegevoegd loodcarbonaat ontstaan. De samenstelling van de plaat was de volgende:

Leidingwater	100	c. c.
Agar	2	G.
Glucose	2	»
Asparagine	0.1	»
K_2HPO_4	0,05	
$PbCO_3$	1	» (overmaat).
$Na_2S_2O_3$	0,5	»

Hierop werd een streepkultuur gemaakt van zestien stammen. De volgende Tabel XII geeft een overzicht van het resultaat der proef na 11 dagen bij 30° C.

TABEL XIII.

OVERZICHT VAN HET VERMOGEN TOT SULFIDE-VORMING UIT NATRIUMTHIOSULFAAT VAN VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BACT. HERBICOLA.

Nummers der stammen.	Groei na 11 dagen.	Mate van sulfidevorming.
No. 1	zwak	vrij sterk
2	krachtig	krachtig
3	matig	zwak
4	zwak	zwak
5	krachtig	krachtig
6	krachtig	krachtig
7	krachtig	krachtig
8	matig	vrij sterk
9	krachtig	krachtig
10	krachtig	krachtig
11	krachtig	krachtig
14	krachtig	krachtig
15	krachtig	matig
16	krachtig	vrij sterk
17	krachtig	vrij sterk
18	krachtig	vrij sterk

Alle onderzochte mikrobenstammen vormden op de plaat sulfide uit thiosulfaat, waarbij echter verschillen in de intensiteit duidelijk aan den dag traden. Zeer fraai was de pikzwarte loodsulfide-vorming der mikroben No. 2 en 14, terwijl het meerendeel bruinzwart loodsulfide had gevormd.

3e. *De reductie van kaliumferricyanide tot kaliumferrocyanide.*

Als een van de wijzen, waarop het reduceerend vermogen van mikro-organismen kan worden aangetoond, geeft Beijerinck aan de reductie van het bruine ferriferricyanide tot het blauwe ferriferrocyanide (Berlijnsch blauw). Deze reactie werd door mij toegepast volgens de reeds eerder door mij beschreven modificatie [1]), die hierop neerkomt, dat men niet het ferriferricyanide als zoodanig in de plaat brengt, maar hierin kaliumferricyanide brengt en na afloop van de kultiveering der mikroben, op eventueel gevormd kaliumferrocyanide met behulp van ferrichloride reageert. Heeft er reductie plaats gevonden, dan ontstaan blauwe velden, tengevolge van de vorming van Berlijnsch blauw.

De samenstelling van de gebruikte plaat was als volgt.

Leidingwater	100	c. c.
Agar	2	G.
Glucose	2	»
Asparagine	0,5	»
K_2HPO_4	0.05	»

Aan de geheel afgekoelde, doch nog vloeibare massa in het kookkolfje voegt men een weinig kaliumferricyanide toe tot duidelijk gele kleur der vloeistof. Hierna giet men den inhoud van het kolfje uit in een glasdoos, waarin deze stolt.

Op de aldus verkregen platen werden de stammen No. 2, 3, 11, 14, 15, 16, 17, en 18 naast elkander afgestreken, waarbij gezorgd werd, dat er een goede hoeveelheid bacteriënmateriaal op de plaat gebracht werd.

Na 2 dagen bij 30° C. waren de streepkulturen voldoend gegroeid; op de plaats der bacteriënstrepen en hier omheen was het gele veld duidelijk opgebleekt door de vorming van zwakker geel gekleurd kaliumferrocyanide. Werd nu de plaat met een verdunde ferrichloride-oplossing [2]) overgoten, dan kleurden zich de bleeke

[1]) De mikrobiologie van de bodemreductie. Archief voor de Suikerindustrie in Ned.-Indië 1917, pag. 1129.

[2]) Het is noodzakelijk, dat de ferri-oplossing ferro-vrij is, hetgeen bereikt wordt door oxydatie met eenige druppeltjes $^1/_{10}$ norm. kaliumpermanganaat.

velden helder blauw, terwijl de mikrobenstrepen zelf donkerblauw gekleurd waren. De grens der blauwe diffusievelden is niet scherp en loopt een weinig diffuus in het gele veld van de plaat uit.

De volgende Tabel XIV geeft de intensiteit der blauwe verkleuring aan.

TABEL XIV.

OVERZICHT VAN H&T REDUCEEREND VERMOGEN TEN OPZICHTE VAN KALIUMFERRICYANIDE VAN VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BACT. HERBICOLA.

Nummers der stammen.	Groei der bacteriënstrepen na 2 dagen.	Intensiteit der blauwe kleur.
No. 2	goed	krachtig
3	goed	goed
8	goed	vrij krachtig
11	krachtig	krachtig
14	krachtig	krachtig
15	krachtig	goed
16	krachtig	krachtig
17	krachtig	krachtig
18	goed	krachtig

Nog moge worden opgemerkt, dat bij deze reductie-reactie het asparagine niet door pepton kan worden vervangen, daar dit laatste zelf zwak reduceerend op het kaliumferricyanide inwerkt.

4e. *De reductie van nitraat tot nitriet.*

Naar het vermogen om nitraat te reduceeren, werd met behulp van de methode van BEIJERINCK, [1]) dus door kultiveering op een daartoe geschikten vasten voedingsbodem, een onderzoek ingesteld. De samenstelling der plaat is daarbij als volgt:

Vleeschwaterextract . . .	100	c.c.
Agar	2	G.
KNO_3	0,1	»
Zetmeel	0,5	»

Hierop werden 8 stammen van Bact. herbicola afgestreken. Na ongeveer 2 dagen groei bij 30° C. hadden de bacteriënstrepen zich goed ontwikkeld en werd de plaat overgoten met een met zoutzuur

[1]) M. W. BEIJERINCK. Über Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfatreduction. Verzamelde geschriften. Dl 3, pag. 117.

aangezuurde joodkalium-oplossing. Het is noodig zich vooraf door een blancoproef te overtuigen, dat het kaliumjodide vrij is van verontreiniging door kaliumjodaat, daar anders het aangezuurde reagens de geheele plaat blauw kleurt door afgescheiden jodium.

De volgende Tabel XV geeft het resultaat der proef.

Tabel XV.

Overzicht van het vermogen tot vorming van kaliumnitriet uit kaliumnitraat van verschillende stammen van bact. herbicola.

Nummers der stammen.	Groei na 2 dagen.	Mate der nitrietvorming.
No. 2	krachtig	geen
3	krachtig	zwak
11	krachtig	geen
14	krachtig	uiterst zwak
15	krachtig	uiterst zwak
16	krachtig	uiterst zwak
17	krachtig	uiterst zwak
18	krachtig	uiterst zwak

Na de reactie werden de platen ter beoordeeling van het resultaat bij opvallend licht tegen witten achtergrond bekeken. Om de bruine of gele groeivelden verschenen twee zônes; de eerste zône, onmiddellijk om de bacteriënstreep, was geheel kleurloos, terwijl de tweede, om de eerste heen, zwak blauw getint was. De onderzochte mikroben bleken in de meeste gevallen in zeer zwakke mate het vermogen te bezitten om nitraat tot nitriet te reduceeren, doch in een tweetal gevallen was deze eigenschap in het geheel niet voorhanden.

Hieraan zij nog toegevoegd, dat bij onderzoek van een stam, geïsoleerd van de oppervlakte der zaadhuid van lijnzaad, op een plaat van boven aangegeven samenstelling na 3 dagen kweeken bij 25° C., bij overgieting der plaatkultuur met aangezuurde kaliumjodide-oplossing, een sterke nitrietreactie werd verkregen.

§ 7. *Enzymatische stofwisselingsprocessen.*

Het is in de mikrobiologie veelal nog gebruikelijk om die stofwisselingsprocessen, waarvoor aangetoond is, dat zij eveneens kunnen verloopen onder den invloed van een uit het organisme te

bereiden enzym, te stellen tegenover een andere groep van stofwisselingsprocessen, waarvoor zulks niet het geval is. Zoo maakt b. v. Beijerinck onderscheid tusschen enzymatische omzettingen en die, welke door katabolisme worden bewerkt. In hoeverre deze onderscheiding werkelijk van principieelen aard is, zal hier in het midden worden gelaten. Op grond van practische overwegingen leek het gewenscht die stofwisselingsprocessen, welke als regel onder den invloed van mikroben-enzymen blijken te verloopen, in een gemeenschappelijke paragraaf te vereenigen, en wel geschiedde dit, omdat aan de wijzen, waarop dergelijke omzettingen in navolging van Beijerinck gewoonlijk worden aangetoond, eenzelfde beginsel ten grondslag ligt. Het principe, volgens hetwelk men in dergelijke gevallen te werk pleegt te gaan, bestaat hierin, dat men de te onderzoeken mikrobe afstrijkt op een vasten voedingsbodem, waarin men de stof brengt, waarvan men de mogelijkheid tot omzetting onder den invloed van een enzym wil nagaan. Met behulp van daartoe geschikte reagentia stelt men dan na eenigen tijd, hetzij het verdwijnen van de te onderzoeken stof, hetzij het ontstaan van de typische splitsingsproducten van die stof vast. Indien nu de gezochte omzetting inderdaad heeft plaats gegrepen, zal men om de mikrobenkultuur heen een veld krijgen, dat in reactie afwijkt van het overige deel van den voedingsbodem.

Hoewel men op verschillende plaatsen in de literatuur aanwijzingen vindt, dat het ontstaan van een dergelijk reactieveld wordt beschouwd als een direct bewijs voor het feit, dat de onderzochte omzetting inderdaad onder den invloed van een in den voedingsbodem diffundeerend enzym plaats grijpt, moge er hier nadrukkelijk op worden gewezen, dat deze conclusie geenszins gerechtvaardigd is. Het feit, dat op een zekeren afstand van de plaats, waar de mikroben zich hebben ontwikkeld, de om te zetten stof uit den voedingsboden is verdwenen, of de typische splitsingsproducten aldaar worden aangetroffen, behoeft nog geenszins een gevolg te zijn van een diffusie van het betreffende enzym in dien bodem.

Om dit in te zien is het noodzakelijk de gevallen, waarin op het verdwijnen van de te onderzoeken stof en de gevallen, waarin op het ontstaan van de splitsingsproducten wordt gereageerd, afzonderlijk in beschouwing te nemen.

Wat nu de eerste genoemde gevallen aangaat moet erop worden gewezen, dat het verdwijnen van de om te zetten stof op eenigen afstand van de plaats der mikrobenontwikkeling een gevolg kan zijn

van het wegdiffundeeren dier stof, veroorzaakt door het verbruik daarvan in de cellen van het te onderzoeken organisme.

Weliswaar zal onder deze omstandigheden steeds weer diffusie van de opgeloste stof uit de omringende zône plaats hebben, waarvan het gevolg zal zijn, dat in het veld, dat de mikrobenmassa direct omringt, geen absoluut verdwijnen, maar slechts een concentratievermindering van de te onderzoeken stof intreedt. Indien echter de concentratie van de te onderzoeken stof in het veld, dat de mikroben direct omringt, werkelijk tot nul daalt, zal men inderdaad moeten aannemen, dat er een enzym, dat de omzetting bewerkt, uit de mikrobenmassa naar buiten is gediffundeerd.

In de tweede der bovengenoemde gevallen, waarin dus op de splitsingsproducten wordt gereageerd, zal men evenwel nimmer zonder meer tot de aanwezigheid van een oplosbaar enzym besluiten. Hierbij is het toch volkomen denkbaar, dat de eigenlijke omzetting in de mikrobencellen zelve plaats heeft, terwijl de gevormde splitsingsproducten van daaruit een diffusieveld tot buiten de mikrobenmassa vormen. Voor zoover het gevormde splitsingsproduct, waarop gereageerd wordt, ongeschikt is om door de mikroben te worden geassimileerd, is dit zonder meer duidelijk. Indien deze assimilatie wel mogelijk is, zal de snelheid, waarmede dit geschiedt, in vergelijking tot de snelheid, waarmede de splitsing wordt bewerkt, bepalen, in hoeverre al of niet een diffusieveld van het voor het onderzoek gebezigde splitsingsproduct optreedt. Hoewel dus het optreden van een dergelijk diffusieveld de mogelijkheid open laat, dat er inderdaad diffusie van een oplosbaar enzym heeft plaats gevonden, behoeft dit anderzijds geenszins het geval te zijn. Dat dit laatste juist is, blijkt uit het feit, dat in de voorafgaande paragraaf voor het aantoonen van de reductie van kaliumnitraat tot kaliumnitriet gebruik is gemaakt van de vorming van een diffusieveld van laatstgenoemde stof om de onderzochte mikrobenmassa, terwijl toch het bestaan van een oplosbare nitraatreductase nimmer kon worden aangetoond, ondanks de vele pogingen, die men daartoe heeft aangewend.

Wanneer dus in het onderstaande van de vorming van een diffusieveld door een typisch splitsingsproduct gebruik zal worden gemaakt voor het aantoonen van een splitsing eener bepaalde stof, moet te voren worden erkend, dat daarmede het strikte bewijs voor het bestaan eener omzetting van de betreffende stof onder den invloed van een oplosbaar enzym niet is gebracht en dus de mo-

gelijkheid blijft bestaan, dat de waargenomen omzettingen niet principiëel afwijken van die, welke in de vorige paragraaf werden beschreven. Zooals reeds gezegd, zijn de hieronder te bespreken omzettingen in een afzonderlijke paragraaf samengevat, omdat het algemeen gebruikelijk is die als voorbeelden van door diffundeerbare enzymen bewerkte splitsingen te beschouwen, welke zienswijze althans in sommige gevallen ook door verdere experimenteele gegevens wordt gesteund.

a. Het vermogen om zetmeel aan te tasten.

Voor het onderzoek naar het vermogen om zetmeel aan te tasten werden de stammen No. 2, 3, 11, 14, 15, 16, 17 en 18 op een kultuurplaat van de volgende samenstelling afgestreken.

Gistwater	100	c.c.
Agar	2	G.
Aardappelzetmeel	1	»
K_2HPO_4	0,05	»

Hierop werden flinke, 1 c.M. breede strepen van de genoemde bacteriën getrokken. Na ruim 1 dag bij 30° C. waren No. 2, 8 en 14 goed gegroeid, No. 3, 11, 15, 16, 17 en 18 matig tot zwak. Nadat de bacteriënmassa onder de waterkraan van de groeistrepen was weggespoeld, werd de plaat overgoten met een verdunde joodjoodkalium-oplossing. Op de blauw geworden plaat bleven de groeistrepen der bacteriën als geheel ongekleurde of zwak blauwpaars getinte lange rechthoeken tegen het donkerblauw der omgeving afsteken. Hieruit kan geconcludeerd worden, dat een zwak vermogen om zetmeel aan te tasten aanwezig is, maar dat dit niet zoo sterk is als bij vele andere mikro-organismen, waarbij ongetwijfeld diastase uit de mikrobenmassa in de plaat diffundeert.

b. Het vermogen om rietsuiker te inverteeren.

Het vermogen om rietsuiker te inverteeren werd onderzocht volgens de door Beijerinck aangegeven auxanographische methode. Daarbij suspendeert men een aanzienlijk aantal cellen van de gewone kaamgist (Mycoderma cerevisiae) in een afgekoelde, nog juist vloeibare agaroplossing, waarin zich behalve rietsuiker de noodige voedingsstoffen bevinden, en laat de massa tot platen stollen.

Daar deze kaamgist rietsuiker niet kan aantasten, zal zij zonder meer in deze platen niet tot ontwikkeling komen.

Strijkt men nu evenwel op dergelijke platen mikro-organismen f. welke de rietsuiker sneller aantasten dan zij de gevormde invertsuiker verwerken, dan zal in het daardoor ontstane diffusieveld er invertsuiker de kaamgist zich vermeerderen, waardoor op die laatsen een ondoorschijnend veld ontstaat.

Voor het onderzoek werd gebruik gemaakt van voedingsoplossingen van een der volgende samenstellingen.

Vleeschwater	100	c.c.
Agar	2	G.
Rietsuiker	5	»

of:

Gistwater	100	c.c.
Agar	2	G.
Asparagine	0,1	»
K_2HPO_4	0,05	»

Voor deze proeven is vanzelf sprekend van essentieel belang, at de gebruikte rietsuiker geheel zuiver is, althans vrij van invertuiker, wat met behulp van Fehling's-proefvocht werd nagegaan.

In onderstaande Tabel XVI is het resultaat der waarnemingen oor acht mikrobenstammen, beoordeeld na 2 dagen, gekultiveerd ij 30° C., weergegeven. Op de beide boven aangegeven voedingsodems bleken de uitkomsten geheel overeen te stemmen.

Tegelijk met deze proeven werden nogmaals parallelproeven net dezelfde mikrobenstammen aangezet, waarbij de zuurvorming p denzelfden voedingsbodem met lakmoes werd nagegaan. De reultaten van deze waarnemingen zijn in de laatste kolom van Tael XVI opgenomen.

TABEL XVI.

OVERZICHT VAN HET VERMOGEN TOT INVERSIE VAN RIETSUIKER VOOR VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BACT. HERBICOLA.

Nummers der stammen.	Groei na 2 dagen.	Intensiteit van den groei van Mycoderma.	Mate der zuurvorming uit rietsuiker.
No. 2	krachtig	goed	goed
3	krachtig	zeer zwak	zwak
11	krachtig	zeer zwak	zwak
14	krachtig	matig	matig
15	krachtig	matig	goed
16	krachtig	matig	goed
17	krachtig	matig	goed
18	krachtig	matig	matig

Op grond van deze resultaten zou men dus geneigd zijn t concludeeren, dat Bact. herbicola inderdaad rietsuiker aantast, e wel met een iets grootere snelheid dan waarmee de gevormd invertsuiker wordt verbruikt. De snelheid der rietsuiker-inversie i evenwel belangrijk kleiner dan die van organismen als de gewon persgist (Saccharomyces cerevisiae), welke, zooals ik mij ten over vloede nog eens overtuigde, een Mycoderma-groeiveld gaf van zee veel grootere afmetingen en intensiteit.

Intusschen moet opgemerkt worden, dat de beoordeeling va het bij de auxanographische methode verkregen resultaat in di gevallen, waarin dit niet geprononceerd is, met voorzichtigheid moe geschieden. In de eerste plaats is het denkbaar, dat de groei va de kaamgist plaats heeft ten koste van bepaalde door de onder zochte bacteriën afgescheiden splitsingsproducten en deze groei du niet altijd behoeft te wijzen op de vorming van invertsuiker. In d tweede plaats is het mogelijk, dat het door Bact. herbicola gevormd zuur op den duur een langzame inversie van de rietsuiker in d plaat heeft bewerkt.

Een aanwijzing, dat deze laatste verklaring niet zonder mee van de hand mag worden gewezen, is gelegen in het feit, dat d intensiteit der gevormde groeivelden vrijwel parallel ging met d mate van zuurvorming.

Ook blijft de mogelijkheid bestaan, dat door de onderzocht stammen wel kleine hoeveelheden invertase worden gevormd, doc dat deze slechts daar haar werking kan ontplooien, waar tevens doo het gevormde zuur voor een optimale waterstof-ionenconcentrat wordt gezorgd. Uit de bekende onderzoekingen van MICHAELIS toch gebleken, dat de werking van de invertase in hooge mate afhankelij is van de concentratie der waterstofionen, en wel zoodanig, dat b media met een $p_H = 7$ deze werking practisch nihil geworden is.

In verband met dit alles zou ik dus niet verder willen gaa dan te besluiten, dat Bact. herbicola in geen geval een krachtig invertasevormer is, zooals b.v. de persgist.

c. Het vermogen tot splitsing van glucosiden.

Door de recente onderzoekingen van WILLSTÄTTER [1]) en zij medewerkers is nog eens duidelijk aan het licht gekomen, dat ve schillende β-glucosiden niet alleen door eenzelfde emulsine-praep

[1]) RICHARD WILLSTÄTTER u. WILHELM CSANYI. Zur Kenntnis des Emulsins. Ze schrift f. Physiol. Chemie. Bd. 117, 1921—1922, pag. 172.
RICHARD WILLSTÄTTER u. GERTRUD OPPENHEIMER. Idem Bd. 121, 1922 pag. 1

raat met zeer ongelijke snelheden worden aangegrepen, maar dat ook voor verschillende emulsine-praeparaten de verhouding van de snelheden, waarmede de verschillende glucosiden worden gesplitst, zeer wisselend was. Op grond hiervan beschouwt WILLSTÄTTER de tot dusver bereide emulsine-praeparaten dan ook als veranderlijke mengsels van uiteenloopende specifieke glucosiden- en polyosen-afbrekende enzymen.

Dit brengt met zich, dat het vermogen van mikro-organismen om één bepaald β-glucoside te splitsen, geenszins behoeft te beteekenen, dat dit organisme in staat is alle andere β-glucosiden eveneens aan te tasten. Een dergelijk onderling afwijkend gedrag ten opzichte van verschillende β-glucosiden was dan ook voor tal van mikro-organismen reeds vastgesteld.

Daar het uiteraard niet uitvoerbaar was, het onderzoek over alle glucosiden uit te strekken, is door mij een keuze gedaan en werd het vermogen der te onderzoeken stammen nagegaan om een drietal glucosiden, n.l. indikaan, aesculine en verder nog een onbekend glucoside, voorkomend in de bladeren van Piper Betle L., te splitsen.

1. Indikaansplitsing [1]).

Voor het onderzoek naar de splitsing van indikaan werden de onderzochte stammen afgestreken op moutagar, waaraan $^1/_{10}$ % zuiver indikaan [2]) was toegevoegd of 5 à 8 druppels per kultuurplaat van een weinig ingedikt waterig-extract, uit indigoblad verkregen. Indien het indikaan wordt gesplitst, vormt zich hieruit naast de glucose indoxyl, dat bij oxydatie in blauw onoplosbaar indigo overgaat. Het resultaat der proefnemingen is in Tabel XVII samengevat.

TABEL XVII.

OVERZICHT VAN HET VERMOGEN TOT INDIKAANSPLITSING DOOR VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BACT. HERBICOLA.

Nummers der stammen.	Groei der bacteriënstrepen na 4 dagen.	Mate der blauwe verkleuring door indigoblauw.
No. 1	krachtig	goed
2	krachtig	goed
3	krachtig	krachtig

[1]) M. W. BEIJERINCK. On Indigo-fermentation. Verzamelde geschriften. Dl. 3 pag. 337.

[2]) Welwillend afgestaan door Ir. J. S. DE HAAN, directeur van het Proefstation der Klattensche Cultuur-Maatschappij.

Nummers der stammen.	Groei der bacteriënstrepen na 4 dagen.	Mate der blauwe verkleuring door indigoblauw.
No. 4	zwak	goed
5	krachtig	goed
6	zwak	geen
7	goed	zwak
8	krachtig	goed
9	matig	zwak
10	zwak	geen
11	krachtig	zwak
12	zwak	krachtig
14	krachtig	zwak
15	krachtig	zwak
16	krachtig	matig
17	krachtig	goed
18	krachtig	matig

Uit de tabel blijkt, dat met een tweetal uitzonderingen, alle stammen in meerdere of mindere mate het vermogen bezitten om indikaan te splitsen.

2. Aesculine-splitsing.

Het aantoonen van de splitsing van aesculine berust op de omstandigheid, dat het daarbij naast de glucose gevormde aesculetine met ferrizouten een roodbruine tot bruinzwarte verkleuring geeft.

Voor het onderzoek van het aesculine-splitsend vermogen werden de onderzochte stammen op moutagar afgestreken, waaraan $^1/_{10}$% aesculine (E. Merck, Darmstadt) en een spoor ferricitraat was toegevoegd.

Het bleek mij later, dat de aesculine-splitsing nog beter verliep, wanneer aan de moutagarplaat krijt werd toegevoegd, hetgeen waarschijnlijk verband houdt met de omstandigheid, dat het in de moutagarplaat gevormde zuur, indien dit niet door krijt wordt geneutraliseerd, remmend werkt [1]). Tabel XVIII geeft een overzicht van het resultaat van de aesculine-splitsing.

[1]) Achteraf beschouwd was het juister geweest een gistagarplaat met aesculin en ferrizout voor de proef te gebruiken.

TABEL XVIII.

OVERZICHT VAN HET VERMOGEN TOT AESCULINE-SPLITSING DOOR VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BACT. HERBICOLA.

Nummers der stammen.	Groei der bacteriënstrepen na 4 dagen.	Mate der aesculine-splitsing.
No. 1	goed	krachtig
2	krachtig	krachtig
3	goed	zwak
4	krachtig	krachtig
5	krachtig	krachtig
6	krachtig	goed
7	krachtig	geen
8	krachtig	krachtig
9	krachtig	goed
10	krachtig	krachtig
11	krachtig	krachtig
12	krachtig	krachtig
14	krachtig	krachtig
15	krachtig	krachtig
16	krachtig	krachtig
17	krachtig	krachtig
18	krachtig	krachtig

Uit deze tabel blijkt, dat wederom met een enkele uitzondering alle onderzochte stammen aesculine, en wel doorgaans in sterke mate splitsen.

3. Splitsing van het glucoside, aanwezig in de bladeren van Piper Betle L.

Door den heer Dr. P. ANEMA, destijds leeraar in de scheikunde aan de Hoogere Burgerschool te Batavia, werd mij reeds geruimen tijd geleden medegedeeld, dat in de bladeren van Piper Betle L. een glucoside aanwezig was, welke de moederstof zou zijn van de welbekende roode kleurstof, die bij het sirih-kauwen ontstaat. Aangezien evenwel aangaande de aanwezigheid van een glucoside in Piper Betle L., voor zoover mij bekend, nog niets is gepubliceerd [1]), wil ik hier eerst uiteenzetten, op welke gronden inderdaad tot het voorhanden zijn van een glucoside in de bladeren van genoemde plant werd besloten. Het bleek mij nu, dat, indien een hoeveelheid

[1]) In de vrij recente verhandelingen van H. H. MANN en medewerkers over de Chemie en Physiologie van de bladeren van Piper Betle L. (Zie Memoirs of the Department of Agriculture in India. Chemical Series Vol. IV, No. 7, 1916, pag. 282) vindt men over de aanwezigheid van een glucoside in de bladeren der bewuste plant slechts vermeld: „no active glucoside seems to be present in the leaf."

ongekneusde en ongeschonden bladeren bij ongeveer 60° C. met water werd gedigereerd, een extract werd verkregen, dat na zorgvuldige neutralisatie met 10% natronloog, de volgende eigenschappen vertoonde.

1. Het versche extract reduceert bij 60° C. Fehling's-proefvocht slechts in zeer geringe mate.
2. Indien het extract te voren eenigen tijd gekookt wordt, heeft bij 60° C. oogenblikkelijk een krachtige reductie van Fehling's-proefvocht plaats. Hetzelfde resultaat wordt begrijpelijkerwijze ook bereikt, indien men het versche extract eenigen tijd met Fehling's-proefvocht kookt.
3. Wordt aan het koude extract sterke loog of alkalicarbonaat toegevoegd, dan verkrijgt het extract eveneens het vermogen bij 60° het Fehling's-proefvocht dadelijk, ofschoon zwak te reduceeren.
4. Kookt men het extract (b.v. 10 c.c. hiervan) gedurende een kort oogenblik met eenige druppels 25% zoutzuur, dan reduceert het extract na afkoeling en neutralisatie Fehling's-proefvocht bij 60° C. oogenblikkelijk en krachtig.
5. De oplossing, verkregen bij de onder 4 genoemde behandeling, vertoont verder de volgende reactie. Na afkoeling en neutralisatie met eenige druppels 2-norm. ammoniak of wat vaste soda tot duidelijk alkalische reactie, ook kenbaar aan de helder bruine verkleuring [1]), worden eenige druppels 3% waterstofsuperoxyde toegevoegd, waardoor een donkerroode verkleuring ontstaat, veel gelijkend op de kleur van bessensap of ferrirhodanide. Na verloop van een uur of langer, gaat de roode kleur in een vuilbruine kleur over. Stelt men naast de genoemde reactie een blanco-proef in, dus zonder het extract vooraf met zuur te koken, dan gaat de bruine kleur der oplossing, na alkalisch te zijn gemaakt, niet of slechts zeer langzaam in een zwakke roode verkleuring over.
6. Behandelt men het extract met een oplossing van emulsine (Merck) en gaat men overigens te werk als onder 5 na de zuursplitsing is beschreven, dan verkrijgt men geheel dezelfde reactie. Wordt de emulsine-oplossing evenwel te voren door korten tijd opkoken inactief gemaakt, dan blijft de reactie achterwege.

[1]) Deze verkleuring is toe te schrijven aan looistof, welke het extract met alle looistofhoudende vloeistoffen gemeen heeft. De aanwezigheid van looistof in het Piper Betle-extract bevestigde ik nog door de reactie met ferrichloride in het juist geneutraliseerde extract.

Op grond van deze eigenschappen meen ik met groote waarschijnlijkheid te mogen besluiten tot de aanwezigheid in het extract van een glucoside, dat door de volgende eigenschappen is gekenmerkt.

Het glucoside heeft een zwakke chemische constitutie, waardoor het onder den invloed van uiteenloopende factoren: langeren tijd koken der waterige oplossing, korten tijd opkoken met verdunde zuren of basen, inwerken van emulsine, wordt gesplitst in een reduceerende suiker en een onbekend nietsuiker-bestanddeel, dat door behandeling met waterstofsuperoxyde in alkalische oplossing een typisch roode verkleuring geeft.

Vervolgens werd door mij nagegaan, in hoeverre de bovengenoemde glucoside-splitsing bruikbaar kon worden gemaakt voor het aantoonen van bacteriën-emulsine. Hiertoe werd allereerst op de volgende wijze een geconcentreerd extract bereid.

Een Erlenmeyerkolf van 2 L. inhoud werd geheel met ongekneusde bladeren gevuld (375 G. blad) en daarna 1 L. water van 60° C. toegevoegd. Vervolgens werd gedurende een uur op het waterbad bij deze temperatuur gedigereerd. Het verkregen extract werd daarna afgeschonken in een tweede Erlenmeyerkolf, eveneens geheel met blad gevuld Men digereert wederom een uur lang bij 60° C. Van 1 L. water uitgaande, krijgt men zoodoende gemakkelijk 750 c. c. extract, dat lichtgeel van kleur is. De oplossing is alleen in geheel gevulde en goed geparaffineerde stopfleschjes houdbaar [1]).

Aanvankelijk is door mij getracht, de kleurreactie op dezelfde wijze toe te passen als dit voor de indikaan- en aesculine-splitsing gebruikelijk is, n.l. door het glucoside, in casu het extract, in plaatkulturen te brengen. Deze pogingen hadden echter niet het gewenschte succes, omdat voor een positief resultaat bij deze wijze van inrichting der proef begrijpelijkerwijze een langere tijdsduur wordt vereischt, waardoor de spontane verkleuring van het extract bezwaren gaat opleveren Om deze reden richtte ik de proef („ringreactie") als volgt in:

1. In een reageerbuis brengt men 10 c. c. extract.
2. Het te onderzoeken bacteriënmateriaal, uit een moutagarbuisreinkultuur, gedurende 3 dagen bij 30° C. gekweekt, wordt aan het buisje met extract toegevoegd en gedurende 1 à 2

[1]) Aan de lucht treedt spoedig een bruine verkleuring in, waarbij de oplossing troebel wordt.

minuten krachtig geschud, waarbij de opening der buis met den duim wordt gesloten.

3. Daarna wordt een geringe overmaat verdunde (2 norm.) ammoniak toegevoegd tot duidelijk alkalische reactie, waarvoor 3 à 4 druppels noodig zijn, en goed doorgeschud. Ook vaste soda kan worden gebruikt. Bij het alkalisch worden slaat de kleur om in zwak bruin.
4. Ten slotte giet men op de schuimlaag der vloeistof, zonder te schudden, drie druppels 3% waterstofsuperoxyde. Onmiddellijk verschijnt aan de zwak bruine vloeistofoppervlakte een donkerroode, bessensapkleurige ring, die tot aan den meniscus $^1/_2$ à 1 c.M. dikte heeft. De intensiteit neemt gedurende de eerste minuten toe en blijft daarna geruimen tijd constant. Na langeren tijd vormt zich evenwel een vuil bruin praecipitaat. De roode kleur kan met rose of violette tint overgaan in de schuimmassa, die deels door het krachtig schudden der vloeistof, deels door de katalase-werking der mikroben (ontleding van waterstofsuperoxyde in water en zuurstof) is ontstaan.

Voert men op dezelfde wijze als boven de blanco-proef uit, d.w.z. zonder de toevoeging van het bacteriënmateriaal, dan blijft de ringreactie uit. De vloeistof aan den meniscus blijft helder bruin of er treedt een zwakke roodbruine verkleuring op, die in geen enkel opzicht gelijkt op den fraaien donkerrooden ring bij de bacteriëele glucoside-ontleding.

Dat door de mikroben een ontleding van het glucoside is bewerkstelligd, blijkt ook hieruit, dat het extract na inwerking der bacteriën en neutralisatie met natronloog (10%), Fehling's-proefvocht bij 60° C. oogenblikkelijk reduceert.

Het bleek, dat alle onderzochte stammen van Bact. herbicola het glucoside splitsten, weliswaar in ongelijke mate, wat uit de verschillen der intensiteit van de ringreactie volgde. De hieronder volgende Tabel XIX geeft voor de onderzochte stammen een overzicht.

Zooals reeds opgemerkt, vertoonen door kookhitte gedoode bacteriën de ringreactie niet meer. Wel blijft de reactie behouden, indien men de bacteriën doodt door voorzichtige pasteurisatie of door behandeling met chloroformdamp.

Voor de pasteurisatie werd het bacteriënmateriaal uit een moutagarkultuur van 3 dagen oud (30° C.) met 2 c. c. steriel leidingwater vermengd en gedurende 15 minuten in een waterbad aan de

temperatuur van 65° C. blootgesteld. Daarna werd snel afgekoeld en voor de ringreactie aan elke gepasteuriseerde bacteriënkultuur 10 c.c. extract toegevoegd.

TABEL XIX.

OVERZICHT VAN HET VERMOGEN TOT SPLITSING VAN HET GLUCOSIDE UIT DE BLADEREN VAN PIPER BETLE L. DOOR VERSCHILLENDE STAMMEN VAN BACT. HERBICOLA.

Nummers der stammen.	Intensiteit der ringreactie.
No. 2	krachtig
3	krachtig
11	krachtig
14	goed
15	goed
16	matig
17	krachtig
18	krachtig

Het dooden der mikroben met chloroformdamp geschiedde in de buiscultuur, welke eveneens 3 dagen oud was (30° C.), door een in chloroform gedrenkt propje watten een weinig voorbij de opening der buis te schuiven, zonder in aanraking met de bacteriënmassa te komen en daarna af te sluiten met een caoutchoucstop. De kultuur werd op deze wijze 5 dagen aan de inwerking van den chloroformdamp blootgesteld, alvorens de ringreactie hiermede werd gedaan. Ter contrôle of de mikroben door pasteurisatie en chloroform werkelijk gedood waren, werd na deze behandeling van elk der onderzochte bacteriënstammen een afstrijking op moutgelatine gemaakt. Hierbij kwam het eenige malen voor, dat de slijmerige mikrobenmassa's op moutgelatine groei gaven, al was het dan ook zwak en zeer vertraagd (4 à 6 dagen). Het is daarom noodig bij deze bewerkingen voor het goed doordringen van de warmte bij pasteurisatie en chloroformdamp die taaie of slijmerige bacteriënkulturen in de buizen dikwijls terdege om te roeren.

De ondervolgende Tabel XX geeft in overzicht het resultaat der ringreactie na pasteurisatie en chloroformbehandeling der onderzochte mikroben. Om de deugdelijkheid van het extract te controleeren, werd wederom een blanco-proef uitgevoerd.

TABEL XX.

OVERZICHT VAN HET VERMOGEN TOT SPLITSING VAN HET GLUCOSIDE UIT DE BLADEREN VAN PIPER BETLE NA PASTEURISATIE EN CHLOROFORMBEHANDELING.

Nummers der stammen.	Na pasteurisatie.	Na chloroformbehandeling.
No. 2	Zwakke reactie; na meer dan 5 min. constant.	Vrij krachtige; reactie na 5 min. constant.
3	Zwakke reactie; na meer dan 5 min. constant.	Zwakke reactie; na meer dan 5 min. constant.
11	Matige reactie; na 3 min. constant.	Zwakke reactie; na meer dan 5 min. constant.
14	Matige reactie; na 3 min. constant.	Krachtige reactie; na 3 min. constant.
15	Zeer zwakke reactie; na meer dan 5 min. constant.	Zwakke reactie; na meer dan 5 min. constant.
16	idem.	idem.
17	idem.	Matige reactie; de ring kwam vrij snel op en was na 3 min. constant.
18	idem.	idem.
Blanco-proef	Gaf na verscheidene uren slechts een zeer zwakke, te verwaarloozen roode verkleuring.	

d. Het vermogen tot splitsen van vetten.

Zooals bekend zijn vele mikro-organismen in staat vetten te verzeepen, waarbij vetzuur en glycerine ontstaan. Heeft deze reactie plaats in een zeer dun geheel doorzichtig vetlaagje, dan ziet men hierin witte, ondoorzichtige plekken optreden, tengevolge van de afscheiding van de zouten der hoogere vetzuren. Van deze reactie is het eerst door EIJKMAN [1]) gebruik gemaakt voor de aantooning van vetsplitsende enzijmen „lipasen", welke door mikro-organismen worden gevormd. Men gaat daarbij als volgt te werk. In een glasdoos met zeer vlakken bodem wordt gesmolten vet in een zeer dunne laag gelijkmatig verdeeld. Dit wordt bereikt door den bodem tijdens de uitspreiding van het vloeibare vet goed warm te houden, d.w.z. boven de stoltemperatuur van het vet. Hierna houdt men de doos goed schuin, waardoor het overtollige vet zich aan den rand

[1]) C. EIJKMAN. Enzymen bij bacteriën en schimmels. Handelingen van het Nederlandsch Natuur- en Geneeskundig Congres. 8, 1901, pag. 171.

van den bodem verzamelt, waarna dit met een kleine sterile pipet wordt verwijderd. Na volledige afkoeling stolt het vet in de doos tot een dun en doorzichtig laagje. Hierop wordt nu agarhoudende voedingsvloeistof gegoten, die tot zeer nabij het stolpunt was afgekoeld, zoodat ze na het uitgieten vrijwel onmiddellijk vast wordt.

In het onderhavige geval werden moutagar-vet-platen vervaardigd en hierop de te onderzoeken stammen afgestreken. Het resultaat na 2 dagen groei bij 30° C. is in Tabel XXI weergegeven.

Tabel XXI.

Overzicht van het vetsplitsend vermogen van verschillende stammen van bact. herbicola.

Nummers der stammen.	Groei na 2 dagen.	Mate der vetsplitsing.
No. 2	krachtig	zwak, doch duidelijk troebelwit
3	krachtig	nihil
8	matig	nihil
11	goed	nihil
14	krachtig	nihil
15	krachtig	zeer zwak
16	krachtig	nihil
17	krachtig	nihil
18	krachtig	nihil

Voor de beoordeeling van het resultaat werden de aanwezige bacteriënmassa's door een waterstraal weggespoeld; daarna werden de platen tegen het licht bekeken. Alleen bij de stammen No. 2 en 15 waren in de vetlaag ondoorschijnend witte vlekken, in plaats correspondeerende met de aangebrachte bacteriënstrepen, ontstaan.

Uit de onderzoekingen van Söhngen is intusschen gebleken, dat het vermogen van mikro-organismen om op beschreven wijze splitsing te bewerken, in hooge mate afhankelijk is van den aard van den gebruikten vasten voedingsbodem. Söhngen immers stelde vast, dat verschillende bacteriën, die op vleeschagar krachtige vetsplitsing bewerkstelligden, dit niet deden op een vleeschagar-glucoseplaat, waarop zij zich toch krachtig vermeerderden. De verklaring van het verschijnsel bleek Söhngen te liggen in het feit, dat de onderzochte bacteriën op de glucose-houdende plaat krachtig zuur produceerden. De hierdoor ontstane hooge zuurgraad verhinderde blijkbaar de afgescheiden lipase haar werking op het vet uit te

oefenen. Dat dit zoo, was bleek uit de omstandigheid, dat het gevormde zuur zelfs in staat was, de vetsplitsende werking te onderdrukken van bacteriën, welke zelf geen zuur uit de glucose vormden en dus op de overige deelen der vleeschagar-glucoseplaat wel krachtig vetsplitsend werkten [1]).

Daar nu Bact. herbicola op moutagar eveneens zuur maakt, was het aangewezen, de bovenbeschreven proef nogeens te herhalen op een voedingsbodem, waar deze zuurvorming achterwege blijft. Daarom werden dezelfde stammen ook nog afgestreken op een zwak alkalisch reageerende vleeschagar-plaat, waaronder weer een vetlaagje was aangebracht. Ofschoon de bacteriën gedurende twee dagen kultiveeren bij 30° C. zich krachtig ontwikkelden, werd toch, wat de vetsplitsing betrof, een geheel negatief resultaat verkregen.

Bact. herbicola bevat dus als regel geen lipase.

e. Het vermogen tot ontleding van waterstofsuperoxyde.

Het is reeds lang bekend, dat tal van mikro-organismen in sterke mate het vermogen bezitten om waterstofsuperoxyde in water en zuurstof te ontleden. De eerste, die bewees, dat dit vermogen geen algemeene eigenschap der levende cel was, was Beijerinck [2]), die in 1893 er de aandacht op vestigde, dat de echte melkzuurfermenten door een absoluut gemis aan vermogen tot ontleding van het waterstofsuperoxyde gekenmerkt waren. Sindsdien is er door Orla Jensen [3]) op gewezen, dat hetzelfde geldt voor de anaërobe boterzuurbacteriën. Het is zeer waarschijnlijk, dat dit zelfs voor alle organismen, die gekenmerkt zijn door een uitsluitend anaërobe leefwijze, doorgaat. De recente onderzoekingen van Hayduck en Haehn [4]) maken het zelfs waarschijnlijk, dat men in de intensiteit van de waterstofsuperoxyde-ontleding, of zooals men dit gewoonlijk uitdrukt, in het katalasegehalte, een maat heeft voor het vermogen tot een aërobe of oxydatieve leefwijze met vrije zuurstof der organismen.

In verband hiermede mocht worden verwacht, dat Bact. herbicola als streng aëroob organisme in goede mate het vermogen zou bezitten om waterstofsuperoxyde te ontleden. Teneinde dit na te gaan, werden van alle achttien te onderzoeken stammen kolo-

[1]) N. L. Söhngen Microbenlipase, Zie Verslagen Koninklijke Academie van Wetenschappen, Dl. 19, 1910, pag. 1263.

[2]) M. W. Beijerinck. Bemerkung über die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds durch lebende Organismen. Verzamelde geschriften, Dl. 3, pag. 43.

[3]) S. Orla Jensen. The lactic acid bacteria. Kobenhavn, 1919, pag. 48.

[4]) F. Hayduck und H. Haehn. Das Problem der Zymasebildung in der Hefe. Biochemische Zeitschrift, Bd. 128, 1922, pag. 568.

niënkulturen aangelegd op moutgelatine of moutagar. Op de verkregen koloniën werden dan eenige druppels gebracht van 3% waterstofsuperoxyde-oplossing. In alle gevallen kon steeds een krachtige gasontwikkeling, die zich door schuimvorming in de opgebrachte druppels verried, worden vastgesteld.

f. Het vermogen tot oxydatie van tyrosine tot melanine.

Verschillende mikro-organismen bezitten het vermogen om tyrosine te oxydeeren tot een karakteristieke verbinding, het melanine, dat, al naar mate de reactie in neutraal of alkalisch medium verloopt, bruinzwart of zwart is. [1])

Voor het onderzoek werden moutagarplaten, waaraan 0,1% tyrosine in een weinig soda-oplossing opgelost, was toegevoegd, bereid. Hierop werden zes stammen afgestreken. Na 2 dagen bij 30° C. gekultiveerd, waren alle bacteriënstrepen krachtig gegroeid, doch van een zwartkleuring was geen spoor te ontdekken. De tyrosine wordt dus door Bact. herbicola niet tot melanine geoxydeerd.

§ 8. *Vergelijking der eigenschappen van de geïsoleerde bacteriënstammen met Bacterium herbicola aureum* (Burri et Düggeli).

Zooals reeds eerder opgemerkt, had het uitvoerige onderzoek naar de eigenschappen der door mij geïsoleerde bacteriënstammen een tweeledig doel.

In de eerste plaats leek het van belang met zekerheid vast te stellen, in hoeverre deze stammen inderdaad, zooals ik van den aanvang af vermoedde, met de door Burri en Düggeli onder den naam Bact. herbicola aureum beschreven mikrobe identiek was.

In de tweede plaats was het noodzakelijk, aangaande de eigenschappen van de door mij uit suikerriet geïsoleerde bacterie zoo nauwkeurig mogelijk georiënteerd te zijn, teneinde een inzicht te verkrijgen in de werking, die mogelijkerwijze door deze mikrobe in den stengel van het suikerriet wordt uitgeoefend.

Terwijl op dit laatste punt in het volgende hoofdstuk nader zal worden teruggekomen, zal hieronder de eerstgenoemde kwestie in beschouwing worden genomen. Hiertoe lijkt het de aangewezen weg om die eigenschappen, welke ook door Burri en Düggeli voor hun bacterie zijn onderzocht, in een tabellarisch overzicht te vereenigen met de uitkomsten, welke door mij bij de in de vorige paragrafen beschreven onderzoekingen werden verkregen. Dit is geschied in Tabel XXII.

[1]) M. W. Beijerinck. Pigments as products of oxydation by bacterial action. Verzamelde geschriften, DI. 5, pag. 6.

Tabel XXII.

Vergelijkend overzicht van de eigenschappen der verschillende onderzochte bacteriënstammen met die van Bact. herbicola aureum (Burri et Düggeli).

Eigenschappen.	Onderzochte stammen	Bact. herbicola aureum (B. et D.)
Vorm	enkel- of dubbel-staafjes	enkel- of dubbel-staafjes
Afmetingen van het enkelstaafje	lengte : 0,6—3,9 μ dikte : 0,6—0,9 „	lengte : 1,5—2 μ dikte : 0,6—0,7 „
Kleuring volgens Gram	negatief	negatief
Eigenbeweging	aanwezig	aanwezig
Aantal en rangschikking der ciliën	maximaal 7 of 8 peritriche ciliën	maximaal 7 of 8 peritriche ciliën [1]
Zoogloea-vorming	dikwijls fraaie zoogloea vormend	zoogloea vormend
Sporenvorming	afwezig	afwezig
Vorm der koloniën op vaste voedingsbodems	vlak en rond, ouder met bochtigen rand	gewoonlijk niet cirkelrond, maar met bochtigen rand
Kleur der oudere koloniën	geel (helgeel, goudgeel of lichtbruin)	geel (goudgeel)
Gelatine-vervloeiing	zwak, matig en krachtig vervloeiend	„Erweichung"
Slijmvorming in vloeibare en op vaste voedingsmedia bij aanwezigheid van suiker	meestal krachtige slijmvorming	slijmvorming
Temperatuuroptimum	Variëerend tusschen 30 en 37° C.	omstreeks 37° C.
Vorming van indol in bouillonkulturen	Veelal ontbrekend, soms een enkele maal krachtig	krachtig

[1]) Door Burri en Düggeli is geen ciliënkleuring verricht. Het vermelde resultaat berust op een door mij verrichte waarneming bij een van klaverzaad geïsoleerden, ongetwijfeld met de origineele Bact. herbicola geheel identieken bacteriënstam.

Hoewel dus, wat enkele eigenschappen aangaat, geringe afwijkingen zijn op te merken, is de overeenkomst der door mij onderzochte bacteriënstammen met Bact. herbicola aureum (Burri et Düggeli), wat het overgroote deel der eigenschappen aangaat zoo onmiskenbaar, dat ik niet aarzel om mijn bacteriënstammen eveneens tot de genoemde soort te rekenen. Dit te meer, daar uit de eerder aangehaalde onderzoekingen van Beijerinck gebleken is, dat deze bacteriënsoort in hooge mate variabel is.

HOOFDSTUK VIII.

De beteekenis van het voorkomen van bacterium herbicola in het serehzieke suikerriet.

§ 1. *De oekologie van Bact. herbicola.*

Nu in het voorafgaande hoofdstuk met afdoende zekerheid is vastgesteld, dat de in practisch alle onderzochte serehzieke rietstengels aangetroffen goudgeel gekleurde bacterie identiek is met Bact. herbicola aureum, is het aangewezen, hier in een nadere beschouwing te treden aangaande de beteekenis van deze vondst.

Daartoe zij hier allereerst een overzicht gegeven van hetgeen tot op heden omtrent de oekologie van dit organisme bekend is geworden.

Aanleiding tot de ontdekking van genoemd organisme door Düggeli was een door hem ingesteld onderzoek naar den aard der bacteriënflora, welke aan de oppervlakte van gezonde plantenzaden en der daaruit gekweekte kiemplantjes voorkomt.

Kort te voren had Burri in een verhandeling, getiteld „Die Bakterien Vegetation auf der Oberfläche normal entwickelter Pflanzen [1])" de meening uitgesproken: „dasz das Bild der Bakterienflora einer Plfanze wie es sich nach Zahl und Art mittels der gebräuchlichen Untersuchungsmethoden feststellen läszt, nicht die Summe der durch Luftströmungen, Insekten, Düngung oder sonst welche Wege auf die Pflanzen gelangten Bakterien darstellt, sondern der Hauptsache nach das Ergebnis einer während des Wachstums der Pflanze auf der Oberfläche derselben stattgefundenen lebhaften Bakterien-entwickelung ist." Deze meening was vooral gegrond op het feit, dat het zeer groote aantal kiemen, dat aan de oppervlakte van gezonde groene plantendeelen werd aangetroffen, niet te verklaren was door uitsluitend rekening te houden met het afzetten

[1]) Centralbl. f. Bakt. 2e. Abt. 1903, Bd 10, pag. 756.

van kiemen uit de lucht, terwijl bovendien het kwalitatieve onderzoek leerde, dat de op de planten voorkomende bacteriënflora zeer belangrijk van de gewone luchtflora afweek.

Het dienaangaande nader door Düggeli ingestelde onderzoek leidde nu tot het resultaat, dat in nagenoeg alle onderzochte gevallen Bact. herbicola aureum het hoofdbestanddeel der op de bladeren, zaden en kiemplanten voorkomende flora vormde. Daarnaast trad Bact. fluorescens op den voorgrond. Düggeli vestigt verder de aandacht op het merkwaardige feit, dat Bact. herbicola slechts in zeer zeldzame gevallen bij de bacteriologische analyse van de lucht wordt aangetroffen, waaruit volgt, dat het zoo regelmatige voorkomen van dit organisme als een specifieke aanpassing ervan, aan de op de oppervlakte der planten geboden levenscondities is toe te schrijven. In dit verband is speciaal melding te maken van de in de meeste kultuurmedia intredende slijmvorming, welke de verklaring geeft, waarom sterke en aanhoudende regens niet in staat zijn, het organisme van de oppervlakte der bladeren en andere plantendeelen weg te spoelen.

Geheel in overeenstemming met dit resultaat is hetgeen Beijerinck in zijn eerder geciteerde verhandeling uit het jaar 1906 omtrent het voorkomen van Bact. herbicola meedeelt. Ook hij kon dit organisme in den regel zonder meer aantoonen in de oppervlakte-flora van groene plantendeelen, hoewel hij als de overheerschende organismensoorten noemt verschillende representanten van het geslacht Dematium. Ook op zaden vond Beijerinck Bact. herbicola zeer algemeen, waarop hij zijn reeds eerder genoemde fraaie isoleeringsmethode van dit organisme baseerde.

Voor zoover mij bekend, wordt in de latere literatuur nergens melding gemaakt van verdere waarnemingen over het voorkomen van Bact. herbicola in de natuur. Slechts moge er nog op worden gewezen, dat Beijerinck [1]) in zijn in 1912 verschenen verhandeling over „Mutation bei Mikroben," het belangrijke feit vermeldt, dat hij de zoogenaamde Ascococcusmutant van Bact. herbicola in groote hoeveelheid in de houtvaten van een van Java toegezonden serehzieken rietstok aantrof.

Uit het bovenstaande blijkt dus, dat Bact. herbicola een zeer typische representant is van de oppervlakte-flora van levende planten. In verband hiermede heb ik allereerst een aantal waarnemingen verricht, teneinde na te gaan, of deze bacterie ook aan de op-

[1]) M. W. Beijerinck. Verzamelde geschriften. DI. V. pag. 53.

pervlakte van gezonde bladeren van het suikerriet was aan te treffen. Het resultaat was, dat inderdaad door afdrukken van bladstukjes op glucose-pepton-agarplaten enkele koloniën van Bact. herbicola tot ontwikkeling kwamen, echter naast een zeer groot aantal koloniën van wilde gisten, Dematiumsoorten, diverse schimmels, enz. Ondanks dit laatste mag men dus toch aannemen, dat Bact. herbicola ook behoort tot de gewone oppervlakte-flora der groene planten in de tropische streken.

§ 2. *Beschouwing omtrent de waarde, toe te kennen aan het feit, dat bij de gevolgde werkwijze Bact. herbicola regelmatig in het serehzieke riet kon worden aangetoond.*

Daar we nu in Hoofdstuk I hebben uiteengezet, dat het binnendringen van alomtegenwoordige kiemen ook in uiterlijk geheel normale planten, in verband met steeds voorkomende beschadigingen van het wortelstelsel, geenszins tot de uitzonderingen behoort, behoeft het op zichzelf geen verwondering te baren, dat ik bij het onderzoek van gezonde rietstokken ook in 15,8% der gevallen de aanwezigheid van Bact. herbicola kon vaststellen.

En dit te meer, daar het vaststellen der allereerste stadia van de serehziekte een uiterst bezwaarlijke, zoo niet onmogelijke taak is, zoodat het geenszins uitgesloten is dat ook onder de onderzochte, uiterlijk geheel normale planten, zich een aantal bevond, hetwelk de ziektekiem reeds in zich droeg.

Een en ander behoeft dus niets af te doen aan de merkwaardigheid van het feit, dat in practisch 100% der gevallen in het serehzieke riet de genoemde bacterie werd aangetroffen.

Om de waarde van dit resultaat nader te kunnen beoordeelen, dient de gevolgde werkwijze nog eens nader onder de oogen te worden gezien. A priori toch zou het denkbaar zijn, dat deze neerkwam op een specifieke ophoopingsproef, waardoor ook een zeer gering aantal individuen van Bact. herbicola in een mengsel van een groot aantal kiemen van anderen aard naar voren werden gebracht, zoodat het regelmatige voorkomen van Bact. herbicola geenszins zou behoeven te leiden tot de conclusie, dat deze bacterie in den serehzieken rietstengel het overgroote bestanddeel der zich daarin bevindende mikroflora zou uitmaken. Op den voorgrond stellende, dat iedere voor een dergelijk onderzoek gebruikte kultuurmethode tot op zekere hoogte electief werkt, in zooverre dat er steeds mikro-organismen zijn aan te wijzen, die in het gebruikte kultuurmedium

zich niet of slechts moeilijk zullen kunnen ontwikkelen, zijn er toch verschillende overwegingen aan te geven, op grond waarvan het althans zeer waarschijnlijk wordt, dat Bact. herbicola inderdaad in het serehzieke riet in grooten getale voorkomt.

In de eerste plaats wil ik erop wijzen, dat de electieve werking van het toegepaste kultuurmedium zich ook bij het onderzoek der normale rietstokken op geheel dezelfde wijze doet gevoelen. Mijn uitkomsten leeren nu, dat daarbij Bact. herbicola slechts in een betrekkelijk gering aantal gevallen kon worden aangetoond en dan nog steeds vergezeld van verschillende andere normale saprophytische bacteriën. Dit bewijst afdoend, dat de verhoudingen voor de gezonde rietstokken belangrijk afwijken van die in de serehzieke stengels, waaruit genoemde bacterie practisch in alle gevallen werd verkregen.

In de tweede plaats moet er de aandacht op worden gevestigd, dat hoewel in vele gevallen gebruik werd gemaakt van een vloeibaar suikerhoudend kultuurmedium om Bact. herbicola in het perssap van serehzieke stengels aan te toonen, daarnaast eveneens talrijke malen Bact. herbicola werd geïsoleerd door directe uitstrijking van het perssap op vaste kultuurmedia, waarbij dan veelal een practische reinkultuur van Bact. herbicola werd verkregen, hetgeen nimmer het geval was, indien dezelfde methode werd gevolgd voor het perssap van normale stengels.

In aansluiting met hetgeen over het gebruik van een vloeibaar kultuurmedium is medegedeeld, kwam het mij gewenscht voor, nader experimenteel vast te stellen, in hoeverre deze door mij gebruikte kultuurmedia inderdaad streng electief voor Bact. herbicola waren te noemen.

Voor deze proeven ging ik uit van klaverzaad, dat met een weinig steriel water in een geflambeerden mortier tot een dunne brij werd gewreven. Wanneer ik van dit papje een uitstrijking maakte op een moutgelatineplaat, verscheen hierop zonder uitzondering na eenige dagen een groot aantal koloniën van Bact. herbicola. Gelijktijdig met het uitstrijken werden nu steeds ook een aantal reageerbuisjes met rietsap of moutextract met hetzelfde papje geïnfecteerd en bij 30° geplaatst. Na eenige dagen werd door hernieuwd uitstrijken op moutgelatineplaten nagegaan, in hoeverre Bact. herbicola zich in de genoemde vloeibare kultuurmedia had ontwikkeld. Het resultaat was, dat in zeer vele gevallen dit organisme in het geheel niet meer werd teruggevonden: blijkbaar was het daarin door andere organismen practisch geheel overwoekerd. Ofschoon de

proeven met de reinkulturen leeren, dat de gebruikte media een zeer krachtige vermeerdering van Bact. herbicola mogelijk maakten, blijkt er toch wel uit, dat zij geenszins in sterke mate electief werken.

In overeenstemming hiermede is het feit, dat het aantoonen van Bact. herbicola in uitgeplante serehzieke bibits moeilijker bleek, naarmate de bibit langer in den grond gelegen had, om ten slotte, als het rottingsproces van de bibit te ver was voortgeschreden, onmogelijk te worden. Ook bij serehzieke stengels, die in het onderste gedeelte te sterk waren aangetast, was het dikwijls moeilijk Bact. herbicola in dit gedeelte aan te toonen, terwijl dan deze bacterie in de hooger gelegen knoopen en leden nog gemakkelijk was te vinden. Hieruit volgt dus, dat ook in de serehzieke stengels Bact. herbicola geleidelijk door andere mikro-organismen wordt overwoekerd en zich dan nog slechts in hoogere gedeelten van den stengel kan handhaven.

§ 3. *Het samengaan van het optreden van het serehsymptoom der roode vaatbundels en het verschijnen van Bact. herbicola in den jeugdigen rietstengel.*

In verband met het voorafgaande leek het nu gewenscht na te gaan, of er, zooals te verwachten was, een nauw verband bestond tusschen het eerste optreden van het serehsymptoom der roode vaatbundels in den jeugdigen rietstengel en het verschijnen van Bact. herbicola in dien stengel. Hiertoe leek het de aangewezen weg een aantal één-oogsbibits, afkomstig van serehzieke stengels, waarin te voren de aanwezigheid van Bact. herbicola was vastgesteld, uit te planten en vervolgens op gezette tijden de jeugdige rietstengeltjes op de aanwezigheid van roode vaatbundels, resp. van Bact. herbicola te onderzoeken.

Alvorens evenwel tot deze eigenlijke proefnemingen over te gaan, kwam het mij noodzakelijk voor ter contrôle een overeenkomstig onderzoek in te stellen bij rietplantjes, welke uit geheel gezonde bibit waren gekweekt.

Hiertoe werd gebruikt pasgekiemde bergbibit (afkomstig van Wonosobo), en wel van de rietvariëteiten EK 2, EK 28, 100 POJ en 247 B. De bibits werden in ruime potten uitgeplant. Hierbij werd, evenals bij de verderop te beschrijven proeven met serehzieke bibits, tegen de gewoonte in het bibitoog naar boven gekeerd, terwijl de bibit zelf voor minder dan de helft harer dikte in de aarde verzonken was. Door deze plantwijze konden de zich aan de jonge spruit

ontwikkelende wortels door den grooten afstand, waarop ze zich van de grondoppervlakte bevonden, niet gemakkelijk in de aarde dringen. De plantjes werden aldus genoodzaakt, verscheidene weken ten koste van de bibit te leven, zoodat bij deze inrichting der proef ook geen mikroben uit den grond eventueel door de spruitwortels in den stengel konden binnendringen. Groeiden deze wortels te lang uit, dan werden ze met een heete schaar afgeknipt. Fig. 10 geeft een afbeelding van de inrichting der plantproef. Hierop zijn de spruitwortels nog niet zichtbaar, daar zij nog niet waren uitgeloopen; alleen de bibitwortels hadden zich ontwikkeld.

De uit de gezonde bibit gekweekte plantjes werden nu na een tijdsverloop, variëerende tusschen 2 en 3 maanden, op de aanwezigheid van Bact. herbicola onderzocht. Daarbij werd tevens vastgesteld, dat in geen der stengeltjes roode vaatbundels waren aan te treffen.

Aangaande de uitkomsten van het bacteriologisch onderzoek geeft onderstaande Tabel XXIII een overzicht.

Tabel XXIII.

Overzicht van de mikroben, aangetroffen in jonge rietplantjes, uit gezonde bibit gekweekt.

Rietvariëteit.	Aantal onderzochte spruiten.	Mikroben.
EK 2	11	Bac. mesentericus
EK 28	10	id
100 POJ	11	Bact. herbicola (in 1 stengel) Bac. mesentericus (in 10 stengels)
247 B	11	Bac. mesentericus en Aërobacter aërogenes.

In 43 onderzochte, gezonde spruiten, werd dus slechts eenmaal Bact. herbicola aangetroffen. Men mag dus concludeeren, dat uit gezonde bibit gekweekte, ongeveer drie maanden oude rietplantjes, nagenoeg zonder uitzondering vrij zijn van Bact. herbicola.

Nadat de boven beschreven blanco-proeven dus een gunstig resultaat hadden opgeleverd, werd tot de eigenlijke proefnemingen met uit serehzieke bibits opgekweekte rietplantjes overgegaan.

Hiertoe werden een achttal één-oogsbibits uitgeplant, verkregen uit stengels van de rietvariëteit SW 3, afkomstig van de Sf. Winongan, afdeeling Ngoeling. Vóór het uitplanten werd in alle bibits

Fig. 10.

Inrichting der plantproef van (serehzieke) bibits.

op den knoop de aanwezigheid van Bact. herbicola vastgesteld. De bibits werden daarna op 10 December 1918 in twee ruime potten uitgeplant.

Op gezette tijden werd nu telkens een plantje met zijn bibit uitgegraven, om bacteriologisch te worden onderzocht.

Bibitplantje No. 1. Onderzocht op 3 Jan. 1919, dus 24 dagen na het uitplanten van de bibit.

Het stengeltje, dicht bij de bibit afgesneden, vertoonde op de dwarse doorsnede in het geheel geen roodgekleurde, serehzieke vaatbundels, evenmin bij de beschouwing met een loupe van 10-voudige vergrooting. De bibit was fraai gaaf en gaf op den knoop nog zeer overtuigend de roode serehzieke vaatbundels te zien.

a. Uit het *stengeltje* werd, na afbranden van het snijvlak, met een kleine, steriele kurkboor een klein rietcylindertje uitgestoken. Met de pers konden hieruit in een proefbuis een paar druppeltjes sap worden opgevangen, waaraan eenige c.c. glucose-pepton-bikaliumphosphaatoplossing werden toegevoegd. Na 24 uren was hierin een zwakke bacteriëngroei ontstaan, die bij onderzoek geen Bact. herbicola bevatten. De mikrobe zelf was een sporenvormer.

b. Van de *bibit* werden 3 monsters uitgeperst en van het sap van elk der monsters een kultuur in glucose-pepton-bikaliumphosphaatoplossing aangelegd. Na 24 uren had zich in de 3 proefbuizen een krachtige mikrobenvegetatie ontwikkeld onder gasvorming. Een weinig van het gele slijmerige bacteriënmateriaal gaf onder het mikroskoop de talrijke, kenmerkende zoogloea van Bact. herbicola te zien. Een plaatkultuur op moutgelatine gaf na 4 dagen koloniën van Bact. herbicola en Aërobacter aërogenes. Deze laatste mikrobe bleek de gasvormer te zijn.

Uit deze proefnemingen blijkt dus, dat Bact. herbicola nog wel in de bibit, maar nog niet in den stengel aanwezig was, terwijl hierin ook geen roode, serehzieke vaatbundels werden opgemerkt.

Bibitplantje No. 2. Onderzocht op 6 Jan. 1919, dus 27 dagen na het uitplanten van de bibit.

Het onderzoek hiervan verliep als bij het vorige plantje. Het stengeltje, nog zonder serehsymptomen, gaf slechts een kultuur van Bac. mesentericus, terwijl 3 buiskulturen van 3 afzonderlijke monsters uit den bibitknoop alle Bact. herbicola bevatten.

Bibitplantje No. 3. Onderzocht op 15 Jan. 1919, dus 36 dagen na het uitplanten van de bibit.

Op dwarse doorsnede van het stengeltje, dicht bij de bibit afgesneden, was een begin van een roode verkleuring merkbaar van serehzieke vaatbundels. In den bibitknoop waren nog roode vaatbundels te zien.

a. Van het *stengel*sap werd een buiskultuur aangelegd, die na 2 dagen een rijkelijke, gistende bacteriënmassa gaf. Daar bij microscopisch onderzoek geen zoogloea werden aangetroffen, werd een onderzoek naar de mikroben gedaan op moutgelatine. Na 2 dagen waren op de plaat vele honderden, typische bruin- tot goudgele koloniën van Bact. herbicola opgegroeid naast eenige tientallen koloniën van Aërobacter aërogenes.

b. Drie sapmonsters van den *bibit*knoop gaven na 2 dagen in de proefbuizen een flinke mikrobenvegetatie. Ook hierbij waren microscopisch geen zoogloea te vinden. Een uitstrijking van het bacteriënmateriaal op moutgelatine gaf na 2 dagen dezelfde koloniën in vorm, kleur en eigenschappen te zien van Bact. herbicola als uit den stengel gekweekt. Hiernaast werden eenige honderden koloniën van Aërobacter aërogenes aangetroffen.

Bibitplantje No. 4. Onderzocht op 15 Jan. 1919, dus 36 dagen na het uitplanten van de bibit.

Dit bibitplantje werd terzelfder tijd onderzocht als het voorgaande, en wel met hetzelfde resultaat. Ook hierbij was een begin van een roode verkleuring der aangetaste vaatbundels in den stengel merkbaar, terwijl de bibitknoop nog de serehsymptomen te zien gaf.

a. Door een kultuur in moutextract, gevolgd door een uitstrijking der verkregen mikroben op moutgelatine, bleek ook hier de mikroflora van den *stengel* te zijn: Bact. herbicola en Aërobacter aërogenes.

b. De *bibit*, op gelijke wijze onderzocht als de stengel, gaf als mikrobenflora: Bact. herbicola en Bac. mesentericus.

Bibitplantje No. 5. Onderzocht op 24 Jan. 1919, dus 45 dagen na het uitplanten van de bibit.

Het stengeltje van dit plantje bezat nog geen eigen wortels. Op dwarse doorsnede vertoonde de spruit een rose kleur en eenige roode, serehzieke vaatbundels. Het verloop der roode vaatbundels in de richting van de stengel-as is bij het monster dikwijls goed waarneembaar langs den omtrek van het rietcylindertje, wanneer dit

uit de boor geschoven wordt. De bibitknoop gaf nog bruinroode vaatbundels te zien.

a. Het onderzoek naar de mikroben in het *stengeltje* met behulp van een kultuur in moutextract en daarop volgende uitstrijking der mikroben op moutgelatine toonde de aanwezigheid aan van: Bact. herbicola, Aërobacter aërogenes en Bac. mesentericus.

b. De *bibit* werd op 3 plaatsen onderzocht. Met behulp van de vloeistofkultuur, gevolgd door een uitstrijking der mikroben op moutgelatine, werden gevonden: Bact. herbicola en Aërobacter aërogenes.

Bibitplantje No. 6. Onderzocht op 5 Febr. 1919, dus 56 dagen na het uitplanten van de bibit.

De stengel van dit plantje vertoonde op dwarse doorsnede geen roode vaatbundels, slechts een pleksgewijze rose, lichtgele tot bruine verkleuring. Uit de stengelbasis waren eenige korte eigen wortels te voorschijn gekomen. De bibitknoop vertoonde roodbruine vaatbundels.

a. De mikroflora van den *stengel*, met behulp van vloeistof en plaatkultuur onderzocht, bestond uit: Bac. mesentericus en Aërobacter aërogenes.

b. Eenzelfde onderzoek voor de *bibit*, op 3 plaatsen van den knoop, gaf aan bacteriën: Bact. herbicola, Aërobacter aërogenes en zeer kleine, ronde en doorzichtige koloniën van een niet nader onderzochte mikrobe.

Bibitplantje No. 7: Onderzocht op 8 Maart 1919, dus 13 weken na het uitplanten van de bibit.

Dit plantje had aan het ondereinde van de spruit eenige korte, dikke en geheel gave wortels gevormd, die langs den stengel naar beneden liepen tot boven het oppervlak van de bibit en zich dus nog op groote hoogte boven den grond in den pot bevonden. Klaarblijkelijk groeiden deze wortels bij de inrichting der proef zeer traag. De dwarse doorsnede van het stengeltje gaf bruinroode vaatbundels te zien, terwijl bij hoogerop gemaakte doorsneden de roode serehzieke vaatbundels zichtbaar werden. In de bibit waren de meeste vaatbundels reeds donker roodbruin, rood en bruin verkleurd, zooals vele in rotting verkeerende bibits te zien geven.

a. In het *stengeltje* kon de aanwezigheid van Bact. herbicola direct in de vloeistofkultuur worden vastgesteld, daar talrijke typische

zoogloea te zien waren. De gisting wees op het voorkomen van Aërobactor aërogenes, hetgeen door een moutgelatine-plaatkultuur werd bevestigd.

b. Een onderzoek van de *bibit*, als bij den stengel verricht, gaf aan mikroben eveneens Bact. herbicola en Aërobacter aërogenes.

Bibitplantje No. 8. Onderzocht op 10 Maart 1919, dus omstreeks 13 weken na het uitplanten van de bibit.

Van dit plantje kan in hoofdzaak hetzelfde als van het voorgaande gezegd worden. Op dwarse doorsnede waren in het stengeltje talrijke roode, serehzieke vaatbundels voorhanden, terwijl de vaatbundels uit den bibitknoop bruinrood waren verkleurd.

a. De mikrobenflora van den *stengel*, met behulp van vloeistof- en plaatkultuur onderzocht, bleek te zijn: 2 variëteiten van Bact. herbicola en bacteriën met kleine, vlakke, gele, niet vervloeiende koloniën, die niet nader werden geïdentificeerd.

b. Als mikroben uit de *bibit*, op gelijke wijze als de stengel op 3 plaatsen onderzocht, werden aangetroffen: Bact. herbicola, Bac. mesentericus en Bac. megatherium. Op de plaatkultuur waren de koloniën van de eerstgenoemde mikrobe in de minderheid aanwezig, hetgeen waarschijnlijk in verband stond met de algemeen ingetreden rotting van de bibit, waarbij overwoekering door andere mikroben was ingetreden.

Uit een en ander mag dus worden besloten:

1. dat bij zeer jeugdige bibitplantjes uit serehzieke bibit aanvankelijk de typeerende roode vaatbundels uitsluitend in de bibit worden aangetroffen;
2. dat gelijktijdig met het optreden der roode vaatbundels in de jonge spruiten ook steeds Bact. herbicola aldaar verschijnt.

§ 4. *Bestaat er aanleiding om in Bact. herbicola de verwekker der serehziekte te vermoeden?*

Overzien wij thans het geheel der waarnemingen aangaande het voorkomen van Bact. herbicola in het suikerriet, dan zien we, dat overal waar in serehzieke rietdeelen het typische symptoom der roode vaatbundels aanwezig is, ook Bact. herbicola, althans aanvankelijk, nimmer ontbreekt. Daar kan nog aan worden toegevoegd, dat zoo dit organisme al niet dé quantitatief belangrijkste representant der in de aangetaste plantendeelen aanwezige mikroflora is, het daarin dan toch in ieder geval in zeer grooten getale voor-

komt. Hiermede is dus voor Bact. herbicola voldaan aan de eerste voorwaarde, die SMITH noodzakelijk acht voor het aanwijzen van een mikro-organisme als verwekker van een plantenziekte.

In verband hiermede lijkt het loonend eens na te gaan, in hoeverre in de in Hoofdstuk VII uitvoerig beschreven eigenschappen van Bact. herbicola aanknoopingspunten zijn te vinden voor het vermoeden, dat dit mikro-organisme de verwekker der serehziekte zou zijn en dus in staat zou zijn zulke gewichtige storingen in den physiologischen toestand van de rietplant teweeg te brengen.

Wanneer men deze kwestie overweegt, is voor een dergelijke opvatting op het eerste gezicht weinig steun te vinden. Bact. herbicola toch heeft zich doen kennen als een organisme, dat althans onder de in het laboratorium gebruikelijke kultuurvoorwaarden gekenmerkt is door een gemis aan vermogen tot het bewerkstelligen van krachtige chemische omzettingen, zoodat het zonder meer niet duidelijk is, hoe door een dergelijk organisme krachtige werkingen op de weefselelementen der rietplanten zouden worden uitgeoefend.

Hiertegenover moet evenwel worden opgemerkt, dat dezelfde opmerking eveneens van kracht is voor tal van andere bacteriën, die men toch met zekerheid als verwekkers van plantenziekten heeft leeren kennen. Zoo is b.v. de door mej. WILBRINK geïsoleerde verwekker der gomziekte ook volgens deze onderzoekster zelve een uiterst teer organisme, dat in vitro niet in staat is, eenigermate belangrijke chemische omzettingen te bewerken. [1]) Zelfs wordt deze mikrobe door tal van uiteenloopende stoffen in haar ontwikkeling belemmerd. In dit verband is het ook niet zonder belang, dat SMITH [2]) in zijn in 1920 verschenen „Introduction to bacterial Diseases of Plants" in het overzicht van een groot aantal bacteriëele verwekkers van plantenziekten erop wijst, dat voor deze geen gemeenschappelijke kultuurkenmerken zijn aan te wijzen. Terwijl sommige door vrij krachtige chemismen zijn gekenmerkt, ontbreken deze bij andere oogenschijnlijk geheel.

Intusschen verdient één eigenschap van Bact. herbicola in bovenbedoeld verband speciale vermelding, en wel is dit het vermogen tot krachtige slijmvorming in suikerhoudende voedingsoplossingen. Dientengevolge toch is het aannemelijk, dat mede in verband met

[1]) l. c. pag. 1431.
[2]) Pag. 36.

de door Dixon [1]) geopende gezichtspunten over de physiologische functie der houtvaten, Bact. herbicola ook in deze vaten krachtig slijmstof zou vormen, wat tot verstopping dier vaten en een daaruit logisch voortvloeiend watergebrek aanleiding zou geven.

In verband hiermede is het niet zonder belang een oogenblik stil te staan bij de beschrijving, die WENT geeft van de in de vaatbundels van ziek suikerriet aanwezige gom. WENT wijst erop, dat men de gomvorming moet afscheiden van het ontstaan van de roode kleurstof. Deze kleurstof toch treedt algemeen op in de celwanden van afstervend riet en ontstaat volgens hem uit de bestanddeelen der celwanden. Daarentegen constateert WENT, dat het niet waarschijnlijk is, dat ook de gom een product van de celwanden der vaten is. Immers, WENT kon waarnemen, dat doorgaans de grens tusschen gom en celwand zeer scherp is, zoodat hij meermalen gom kon aantreffen, die van den wand was losgeraakt en waarin toch alle oneffenheden van den wand waren afgedrukt. (Zie fig. 9, Plaat I, WAKKER en WENT). Weliswaar bestrijdt WENT uitdrukkelijk de meening, dat de gomvorming zou moeten worden toegeschreven aan de werking van mikro-organismen. Typeerend is zijn opmerking: „In de gom vinden wij meestal geen bacteriën of schimmels, hoewel het korrelig uiterlijk der pas ontstane gom weleens aanleiding heeft gegeven tot vergissingen, daar men meende hierin bacteriën te kunnen waarnemen." Hiertegenover moet worden opgemerkt, dat het in vele gevallen uiterst bezwaarlijk is, in dichte bacteriën-slijmmassa's de afzonderlijke bacteriën als zoodanig te herkennen. Een typisch voorbeeld hiervan geven de zoogloea van Bact. herbicola, welke een granulatie vertoonen, geheel in overeenstemming met het korrelig voorkomen der door WENT waargenomen gom.

Als verder argument, dat de gom kan ontstaan buiten de inwerking van mikro-organismen, haalt WENT de uitkomst van een proef van VALETON aan. „Deze maakte een gat in een rietstengel, waarin een wattenprop geplaatst werd, die met sublimaat gedrenkt was. Rondom de wond stierf het stengelweefsel af door de vergiftige werking van het sublimaat, maar aan dit doode weefsel grensden vaatbundels, die met gom gevuld waren, niettegenstaande hier toch door het sublimaat het binnendringen van alle mikro-organismen was tegengehouden." Deze redeneering is nu inderdaad volkomen bewijzend, zoolang men aanneemt, dat de mikro-organismen uitsluitend door de aangebrachte wond in den rietstengel in de genoemde

[1]) Reeds besproken in Hoofdstuk I § 3.

vergomde houtvaten kunnen doordringen. Nu mijn proeven echter overtuigend hebben aangetoond, dat in iederen willekeurigen rietstengel nagenoeg zonder uitzondering mikro-organismen aanwezig zijn, is het natuurlijk toch zeer wel mogelijk, dat de gomvorming ook in dit geval door mikro-organismen is bewerkt. En dit te meer, daar toch uitdrukkelijk wordt opgemerkt, dat de gomvorming uitsluitend optrad in die deelen van het weefsel, welke onmiddellijk aan het doode weefsel grensden en waarin de sublimaat dus niet was doorgedrongen.

Op grond van één en ander lijkt het dus nog geenszins uitgesloten, dat mikro-organismen in het algemeen bij de gomvorming betrokken zouden zijn, en meer in het bijzonder heeft de veronderstelling niets onaannemelijks, dat in het geval van het serehzieke riet, zoogloea- en slijmmassa's van Bact. herbicola de als gom beschreven verstoppingen in de vaatbundels van de rietstengel zouden zijn. In dit verband zij er dan nog aan herinnerd, dat een kenner bij uitnemendheid van Bact. herbicola, als Prof. Beijerinck, [1]) melding maakt van het in groote hoeveelheid voorkomen van Bact. herbicola in de houtvaten van serehziek suikerriet.

De mogelijkheid, dat Bact. herbicola inderdaad de verwekker van de serehziekte zou kunnen zijn, scheen dus geenszins uitgesloten.

Toch was het mij van den aanvang af duidelijk, dat hieromtrent nog groote reserve in acht moest worden genomen. Immers, alvorens een dergelijke verstrekkende conclusie mocht worden getrokken, moest eerst worden uitgemaakt, in hoeverre Bact. herbicola ook voldeed aan de 3de en 4de voorwaarde, welke door Smith zijn geformuleerd om een organisme tot verwekker eener plantenziekte te stempelen.

De volgende drie hoofdstukken geven verslag van de proefnemingen, die ten doel hadden de beide genoemde punten aan het experiment te toetsen.

HOOFDSTUK IX.

Proefnemingen met het opzuigen van reinkulturen van Bacterium herbicola in gezonde bebladerde rietstengels.

Ter voorloopige oriënteering aangaande de vraag, in hoeverre

[1]) M. W. Beijerinck. Mutation bei Mikroben. Verzamelde geschriften. Dl. V, pag. 53.

Bact. herbicola eveneens voldoet aan den 3den door SMITH geformuleerden eisch, n.l. dat door inenting van een reinkultuur dezer mikrobe in gezonde planten, de karakteristieke symptomen van de ziekte bij de ingeënte planten worden teweeggebracht, werden nu in de eerste plaats de volgende proeven ingesteld.

Normale, flink bebladerde en bijna volwassen rietstengels werden in het volle zonlicht in reinkultuursuspensies van Bact. herbicola geplaatst. Vervolgens werd nagegaan, op welke wijze de rietstengels op het inzuigen der bacteriënsuspensie reageerden. In het bijzonder werd vastgesteld, in hoeverre wellicht voor de serehziekte specifieke symptomen optraden.

In § 1 van Hoofdstuk VI is een overzicht gegeven van de belangrijkste van deze symptomen. De meeste der aldaar vermelde symptomen manifesteeren zich slechts tijdens het verloop van het ziekteproces. Een uitzondering hierop maakt intusschen het symptoom van de roode verkleuring der vaatbundels, dat algemeen wordt beschouwd als eerste aanwijzing voor het intreden van den ziektetoestand.

Als kriterium voor het voorkomen van serehziekte in rietaanplantingen geldt dan ook allerwege de aanwezigheid van roode vaatbundels in den doorgesneden rietstengel, zooals deze door eenvoudige microscopische waarneming is vast te stellen.

Intusschen wees ik reeds eerder op de tot voorzichtigheid manende omstandigheid, dat deze roodkleuring ook bij de aantasting van het riet door de z.g. gomziekte optreedt.

Dit neemt niet weg, dat het toch ten eenenmale noodzakelijk was na te gaan, in hoeverre bij de boven aangeduide opzuigproeven met reinkultuursuspensies van Bact. herbicola dit eerste symptoom eener serehziekte-aantasting wellicht eveneens optrad.

De nadere inrichting der opzuigproeven blijkt uit de volgende beschrijving.

Een wijdmondsche flesch van omstreeks 5 L. inhoud werd gevuld met $^1/_2$ à 1 L. leidingwater. Van een reinkultuur van de te onderzoeken bacterie (op mout- of glucose- peptonagar) van 1 à 2 dagen oud, werd in 50 c. c. leidingwater een homogene suspensie gemaakt, welke daarna in de wijdmondsche flesch werd uitgegoten en door omschudden gelijkmatig in het aanwezige water werd verdeeld. Per rietstok werden 1 à 2 reinkultuurbuizen gebruikt. De flesch werd nu op een aardewerkschotel geplaatst en tegen verwarming en direct zonlicht beschut door een aardewerkmantel, welke boven van

Fig. 11.
Inrichting der opzuigproef.

een ruime opening voorzien was voor het doorlaten der in te brengen rietstengels.[1])

Een zeker aantal van dergelijke beschermde flesschen, voorzien van de bacteriënsuspensie, werden in een rij geplaatst, vóór een houten latwerk of staketsel, op een open, zonnige tuinplek.

Van elk der te infecteeren versche, bebladerde rietstokken werd het onderste deel ter lengte van eenige decimeters verwijderd en ten slotte onder water in een wijden emmer nogmaals een schijfje afgesneden. De stengel met het geheel natte, versche snijvlak werd nu onmiddellijk in de mantelflesch met bacteriënsuspensie overgebracht.

Afhankelijk van de dikte der rietstokken konden in één flesch 4 tot 6, soms ook meerdere stengels geplaatst worden. Deze werden tot een bundel stevig samengebonden en ten slotte flink aan het achterliggende bamboe-latwerk bevestigd, zoodat het geheel bij windvlagen voor omvallen en tegen breuk gevrijwaard was. Fig. 11 geeft de afbeelding van de beschreven opstelling. In de rij der flesschen is de tweede van rechts van zijn beschuttenden mantel ontdaan om de flesch met haar inhoud zichtbaar te maken.

De opzuigproeven werden gedurende de morgenuren genomen, daar deze bij het onderzoek van Kuijper de gunstigste bleken te zijn wegens het dan plaats hebbende groote watertransport door den stengel. Meestal was dan ook reeds vóór den middag de bacteriënsuspensie door de stengels geheel opgenomen. Was echter de suspensie te dicht, dan trad spoedig verstopping der vaten in, zoodat slechts een gedeeltelijk opnemen der bacteriën plaats greep. De door mij verrichte opzuigproeven met verschillende rietvariëteiten, in Mei en Juni geplant, slaagden het best in de eerste drie maanden van het daarop volgende jaar. Ofschoon deze tijd in den vollen regenmoesson viel, kenmerkten zich de morgenuren dezer dagen van het jaar 1919 veelal door helder en zonnig weer, bij uitstek geschikt voor de proefneming.

Nadat de geheele bacteriënsuspensie door de stengels was opgenomen, werden de flesschen verscheidene malen met gewoon water bijgevuld en bleven de rietstokken hierin omstreeks 4 dagen staan.

De eerste reeks proefnemingen omvatte de rietvariëteiten: EK 2, EK 28, 90 F, 160 F, SW 3, SW 16, DI 52, Zwart Cheribon, 2064

[1]) De inrichting dezer proefnemingen is in hoofdzaak ontleend aan de werkwijze door J. Kuijper, toegepast bij zijn onderzoek over de transpiratie van het suikerriet. Zie: Waarnemingen over de transpiratie van het suikerriet. Archief voor de suikerindustrie in Ned.-Indië, 1915.

POJ. 1991 POJ, 1858 POJ en 1547 POJ. Van elke rietsoort werden 24 stokken voor de proef gebruikt.

Voor het bereiden der suspensie werd Bact. herbicola, stam No. 2 gebruikt.

Na omstreeks 2 dagen werden de roodgekleurde vaatbundels in den 2den of 3den knoop boven het snijvlak van den stengel, soms zelfs hooger, op overlangsche doorsnede zeer fraai zichtbaar.[1]) Deze „serehknoopen" verschenen in vrijwel alle stokken. Fig. 12 vertoont twee stengels met „serehknoopen" in een stok van de rietvariëteit SW 16, waarvan de rechtsche twee vooral duidelijk zijn.

De tweede reeks proefnemingen omvatte de rietvariëteiten: EK 28 en EK 30.

Hierbij werd Bact. herbicola stam No. 15 gebruikt. Na 3 dagen waren in de eerste twee knoopen boven het snijvlak zeer fraaie „serehknoopen" te zien. De meeste stokken vertoonden dit beeld.

De derde reeks proeven omvatte de rietvariëteiten:

Gestreept Preanger, Zwart Cheribon, Zwart Borneo, Bandjarmasin hitam.

Hierbij werd gebruik gemaakt van Bact. herbicola stam No. 11. Na. 3 dagen waren in eenige knoopen boven het snijvlak de „serehknoopen" vrij goed of goed in nagenoeg alle stokken te zien.

Hierbij dient de aandacht te worden gevestigd op het opmerkelijke verschijnsel, dat in vele gevallen de typische roodkleuring in de knoopen eerst na eenige minuten te voorschijn komt bij het blootstellen aan de lucht. Ook bij de serehzieke stengels in de ondernemings-aanplantingen kan men dit verschijnsel waarnemen. Bij de practijk van het onderzoek naar serehziekte in de riettuinen en bij de bibitkeuring wordt hiermede ook volop rekening gehouden. De met de selectie van het riet belaste arbeidsters plegen toch steeds de te onderzoeken stengels en bibits eerst aan te snijden, om eerst na verloop van eenigen tijd bij de aangesneden knoopen terug te keeren en dan de al of niet aanwezigheid der roode strepen vast te stellen.

Nog zij vermeld, dat bij alle proefnemingen eenige contrôlestokken onder overigens gelijke omstandigheden in water werden geplaatst, dat vele malen per dag werd ververscht. Hierbij vertoonden de knoopen boven het snijvlak nimmer een roode verkleuring der vaatbundels op de knoopen.

---

[1]) Soms waren de roodgekleurde vaatbundels reeds 8 uren na het opzuigen der bacteriën te zien.

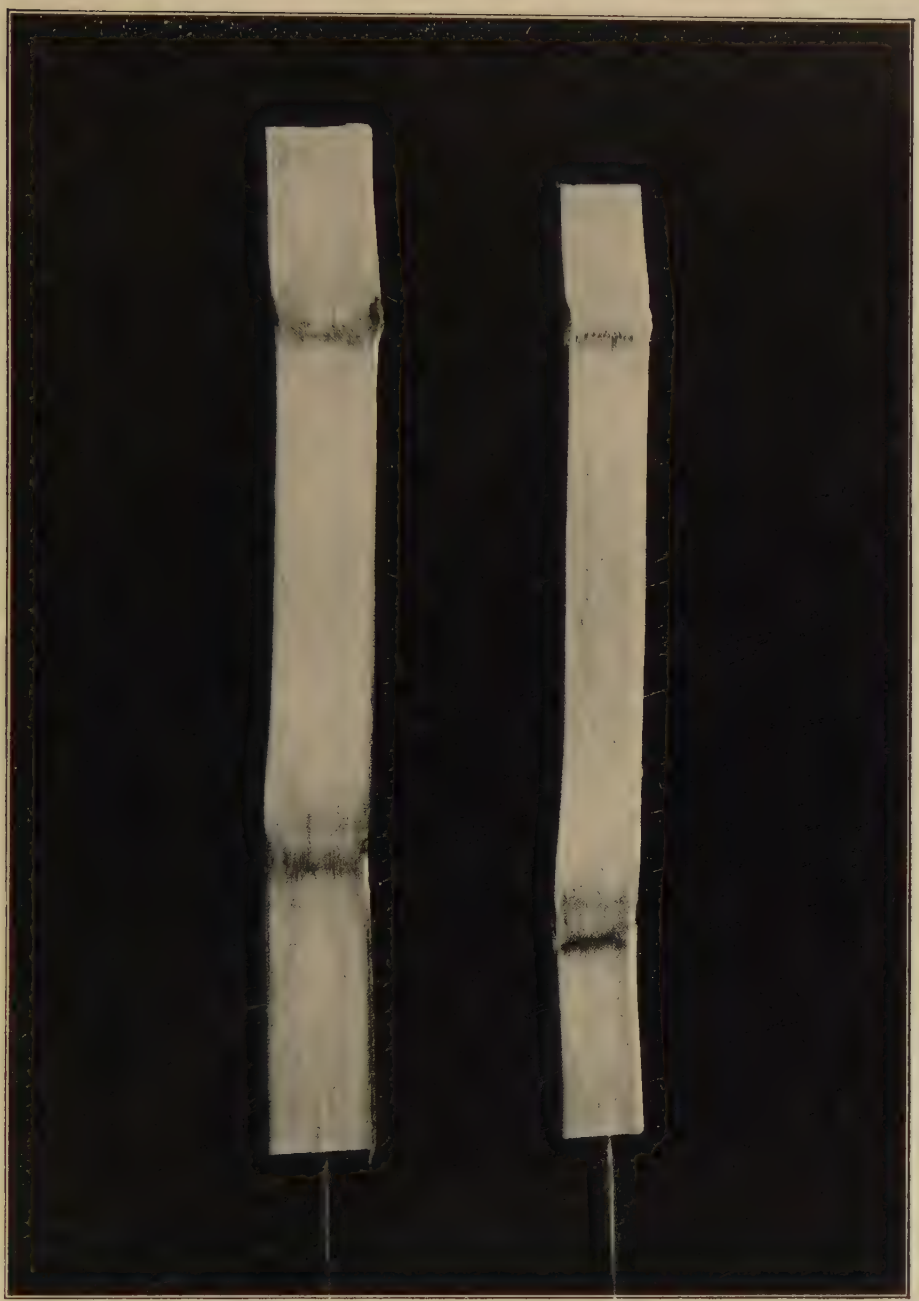

Fig. 12.

De aantasting der vaatbundels in de stengelknoopen („serehknoopen") van de rietvariëteit SW16 als resultaat van de opzuigproef met Bact. herbicola (stam No. 2) na omstreeks 2 dagen.

Bij de proefnemingen met de bacteriënsuspensies werd uit de knoopen met de roode vaatbundels met goed gevolg op de gebruikelijke wijze de gebezigde stam van Bact. herbicola teruggeïsoleerd.

Het geheel samenvattende mag worden geconcludeerd, dat Bact. herbicola in staat is het symptoom van beginnende serehziekte in den rietstengel te weeg te brengen. Het was nu evenwel aangewezen nader vast te stellen, in hoeverre de roode verkleuring der vaatbundels uitsluitend door Bact. herbicola en niet door andere mikro-organismen wordt bewerkt. Alleen als dit zou komen vast te staan, zou in den uitslag van de bovenbeschreven proefnemingen een nadere aanwijzing mogen worden gezien, dat genoemde mikrobe ook als verwekker der serehziekte optreedt.

Deze kwestie zal nu in het volgende hoofdstuk nader onder de oogen worden gezien.

HOOFDSTUK X.

Het serehsymptoom der roode vaatbundels.

§ 1. *De roode verkleuring der vaatbundels veroorzaakt door andere mikroben dan Bact. herbicola.*

Zooals aan het slot van het voorafgaande hoofdstuk werd meegedeeld, was het aangewezen vast te stellen, in hoeverre het serehsymptoom der roode vaatbundels als een specifiek gevolg van de aanwezigheid van Bact. herbicola in de rietstengels mocht worden beschouwd.

Dat in dit opzicht de specificiteit der werking niet volkomen zou zijn, was reeds van te voren in zooverre duidelijk, dat, zooals we ook reeds eerder opmerkten, ook de verwekker van de gomziekte van het suikerriet in staat is hetzelfde symptoon te voorschijn te roepen, waarbij te bedenken valt, dat dit laatste door mej. Wilbrink geïsoleerde organisme zeker niet identiek is met Bact. herbicola, wat mij o.m. ook bleek bij herhaling van de door deze onderzoekster beschreven waarnemingen, welke tot een volledige bevestiging van de door haar bereikte resultaten leidde.

Op grond van dit feit lag het voor de hand in de eerste plaats nog verschillende andere door mij uit normaal en serehziek suikerriet geïsoleerde organismen onder dezelfde voorwaarden, waarop dit voor

Bact. herbicola was geschied, op hun vermogen tot het verwekken van roode verkleuringen der vaatbundels te onderzoeken.

Hiertoe werden dus op de beschreven wijze opzuigproeven ingezet met reinkulturen van Aërobacter aërogenes, Bac. mesentericus en Bac. megatherium. Steeds werd hiernaast een vergelijkingsproef met Bact. herbicola (stam No. 2) ingezet. Voor elk van de bacteriënsoorten werden 4 rietstengels voor de proef gebruikt.

Aërobacter aërogenes.

Een eerste serie waarnemingen werd ingezet met de rietvariëteiten EK 28 en DI 52.

Na ruim 24 uren waren in de stengels, welke in de A. aërogenes-suspensie hadden gestaan, geen roode vaatbundels aan te treffen, terwijl dit wel het geval was bij de contrôleproef van Bact. herbicola.

Een tweede serie waarnemingen werd ingezet met de rietvariëteit SW 3.

Na drie dagen waren in den 2^{den} knoop van onderen gerekend zwak roodgekleurde vaatbundels te zien, terwijl met Bact. herbicola in denzelfden tijd op gelijke hoogte in den stengel duidelijk roodgekleurde vaatbundels te zien waren.

Een derde serie had wederom betrekking op de rietvariëteit DI 52.

Na drie dagen waren zoowel bij A. aërogenes als bij Bact. herbicola in den 2^{den} en den 3^{den} knoop van onderen gerekend fraaie roode vaatbundels zichtbaar.

Een vierde serie werd verricht met de rietvariëteit Zwart Cheribon.

Na drie dagen waren in den 2^{den} en den 3^{den} knoop van onderen gerekend zwak roodgekleurde vaatbundels te zien, terwijl met Bact. herbicola in denzelfden tijd en op gelijke stengelhoogte een sterke verkleuring der vaatbundels optrad.

Een vijfde serie proeven had betrekking op de rietvariëteit SW 16.

Na drie dagen vertoonde de 2de knoop van onderen gerekend slechts een zeer zwakke, roode verkleuring der vaatbundels, daarentegen Bact. herbicola in denzelfden tijd en op gelijke hoogte duidelijk roodgekleurde vaatbundels.

Bac. mesentericus.

Hiermede werd slechts één serie waarnemingen verricht, en wel met de rietvariëteiten EK 28, 247 B en 100 geel.

Na drie dagen werden zoowel bij Bac. mesentericus als bij Bact. herbicola in de stengels dezer rietvariëteiten ter hoogte van den 2den en den 3den knoop van onderen gerekend duidelijk roodgekleurde vaatbundels waargenomen.

Bact. megatherium.

Een eerste serie waarnemingen werd verricht met de rietvariëteit SW 3.

Na drie dagen gaven de 2de en de 3de knoop van onderen gerekend fraai roodgekleurde vaatbundels te zien, evenals bij Bact. herbicola in denzelfden tijd en op gelijke hoogte.

Een tweede serie proefnemingen werd ingezet met de rietvariëteit SW 16.

Na twee dagen waren in den 2den knoop van onderen gerekend zwak roode vaatbundels te zien, terwijl Bact. herbicola in denzelfden tijd en op gelijke stengelhoogte duidelijk roodgekleurde vaatbundels te zien gaf.

Een derde serie proeven geschiedde met de rietvariëteit DI 52.

Zoowel Bact. megatherium als Bact. herbicola gaven na 3 dagen in den 2den en den 3den knoop van onderen gerekend fraai roodgekleurde vaatbundels te zien.

Een vierde serie waarnemingen had betrekking op de rietvariëteit Zwart Cheribon.

Na twee dagen waren in den 2den en den 3den knoop van onderen gerekend duidelijk roode en donkerbruin gekleurde vaatbundels zichtbaar. Bact. herbicola gaf in denzelfden tijd en op dezelfde stengelhoogte duidelijk roode vaatbundels te zien.

Het leek nu verder van belang na te gaan, in hoeverre ook bacteriën, die tot dusver nimmer in het normale of serehzieke suikerriet waren aangetroffen, in staat waren de vaatbundels rood te kleuren. Daarvoor viel mijn keuze op Bact. Solanacearum, waarvan een uit slijmzieke tabaksplantjes geïsoleerde kultuur mij welwillend door Dr. J. Honing van het Deliproefstation te Medan ter beschikking werd gesteld. Wel is waar heeft Van der Wolk [1]) de hypothese uitgesproken, dat deze bacterie ook bij de serehziekte van het suikerriet een belangrijke rol zou vervullen, doch hiervoor werd nimmer eenig positief bewijs aangevoerd, terwijl eenige opzettelijk daartoe ingerichte proefnemingen om Bact. Solanacearum

[1]) P. C. van der Wolk. Onderzoekingen over de bacterieziekte, speciaal met het oog op hare beïnvloeding door onkruiden, met een aanhangsel over de serehziekte van het suikerriet. De Indische Mercuur 1914, jaarg. 37. No. 28.

in deelen van serehziek riet aan te treffen, een negatief resultaat hadden.

Bact. Solanacearum.

Een eerste serie waarnemingen werd verricht met de rietvariëteit EK 28.

Na vier dagen waren fraai roodgekleurde vaatbundels zichtbaar in den 2den en den 3den knoop van onderen gerekend. Toch is de gelijkenis met de roode vaatbundels bij de serehziekte niet in alle opzichten volkomen, daar er te veel bruinroode vaatbundels voorkomen. In denzelfden tijd en op gelijke stengelhoogte gaf Bact. herbicola duidelijk roodgekleurde vaatbundels te zien.

Een tweede serie proeven had betrekking op de rietvariëteit SW 3.

Na drie dagen gaf de 2de knoop van onderen gerekend een zwakke roode verkleuring der vaatbundels te zien; daarentegen waren bij Bact. herbicola in denzelfden tijd en op gelijke stengelhoogte duidelijk roodgekleurde vaatbundels zichtbaar, ook in den 3den knoop.

Een derde serie proefnemingen geschiedde met de rietvariëteit DI 52.

Zoowel Bact. Solanacearum als Bact. herbicola gaven na drie dagen in den 2den en den 3den knoop van onderen gerekend fraai roodgekleurde vaatbundels te zien.

Een vierde serie waarnemingen werd verricht met de rietvariëteit Zwart Cheribon.

Zoowel Bact. Solanacearum als Bact. herbicola gaven na twee dagen in den 2den en den 3den knoop van onderen gerekend duidelijk de roode vaatbundels te zien.

Een vijfde serie proeven geschiedde met de rietvariëteit SW 16.

Na twee dagen waren in den 2den knoop van onderen gerekend zeer zwak roodgekleurde vaatbundels zichtbaar, terwijl Bact. herbicola in denzelfden tijd en op gelijke stengelhoogte duidelijk roode vaatbundels te zien gaf.

Uit al deze proefnemingen blijkt dus onmiskenbaar, dat verschillende andere bacteriën dan Bact. herbicola, waaronder ook een soort, die nimmer in het suikerriet werd aangetroffen, in staat zijn het serehsymptoom der roode vaatbundels in gezonde rietstengels te veroorzaken.

Eenerzijds volgt hieruit, dat het positieve resultaat der in

Hoofdstuk IX beschreven opzuigproeven met reinkultuursuspensies van Bact. herbicola zich niet leent om te dienen als nadere aanwijzing ten gunste van de opvatting, dat deze bacterie de verwekker der serehziekte zou zijn. Anderzijds houden de verkregen uitkomsten een waarschuwing in, om geen te groote waarde toe te kennen aan de resultaten, welke verkregen worden bij het in de practijk toegepaste onderzoek naar serehziekte in de rietaanplantingen.

§ 2. *Microscopisch onderzoek van de bij de opzuigproeven verkregen roodgekleurde vaatbundels.*

Hoewel in de practijk met de microscopische beoordeeling van de aanwezigheid van roode vaatbundels in den rietstengel wordt volstaan, leek het gewenscht na te gaan, of de bij de opzuigproeven verkregen roode verkleuring ook bij microscopisch onderzoek een volledige overeenstemming vertoonde met die, welke bij de serehziekte wordt aangetroffen. In dit verband is het van belang, dat reeds Went erop wijst, dat het ontstaan van de roode kleurstof in het suikerriet moet worden afgescheiden van de eigenlijke gomvorming in de vaten. Het bleek nu bij microscopisch onderzoek, dat evenals dit voor typisch serehziek riet geldt, ook de stengels bij de bovenbeschreven opzuigproeven duidelijke gomvorming vertoonden, terwijl het overige beeld niet te onderscheiden is van dat, hetwelk het serehzieke riet oplevert. Vorming van gom, waarvan de kleur alle schakeeringen van geel, rood en violet vertoonde, werd zoowel in het hout- als in het zeefvaatgedeelte van den vaatbundel waargenomen, wat dit laatste aangaat, vooral bij sterke aantasting van het vaatbundelsysteem.

§ 3. *De roode verkleuring der vaatbundels kan door uiteenloopende chemicaliën worden bewerkstelligd.*

Zooals wij in Hoofdstuk II zagen, was reeds door Raciborsky aangetoond, dat ook looizuur-oplossingen in staat zijn in normale rietstengels een roode verkleuring der vaatbundels te weeg te brengen.

In verband hiermede was het dus geenszins uitgesloten, dat de in de opzuigproeven van verschillende bacteriën opgetreden roode verkleuring der vaatbundels moest worden toegeschreven aan de werking van de door de gebruikte mikroben afgescheiden, voor de rietcellen vergiftige, oplosbare stofwisselingsproducten.

Om deze reden ben ik ertoe overgegaan het verschijnsel van de roode verkleuring der vaatbundels aan een nadere studie te onderwerpen.

Daartoe werd allereerst voor een groot aantal chemische verbindingen van uiteenloopenden aard nagegaan, in hoeverre zij in staat waren de bewuste roode verkleuring te verwekken. Daarna werden de overige factoren nagegaan, die op het proces der roode verkleuring van invloed zijn.

De hierop betrekking hebbende proefnemingen werden alle verricht in het Mikrobiologisch Laboratorium der Technische Hoogeschool te Delft, onder leiding van Prof. Dr. M. W. Beijerinck. Het benoodigde suikerriet was afkomstig uit de kassen van het Laboratorium voor Technische Botanie te Delft, en dankte ik aan de welwillendheid van den Directeur van dit laboratorium, Prof. Dr. G. van Iterson Jr. Daar dus slechts over een beperkt aantal rietstokken kon worden beschikt, richtte ik mijn proeven op eenigszins andere wijze in dan dat tot dusver het geval was geweest.

Uit de lengte- en dwarsdoorsneden van den stengel werden onder voorzorgen, welke infectie van buitenaf uitsloten, kleine stukjes afgesneden. Deze werden in steriele glasdoozen aan de inwerking van verschillende agentia blootgesteld.

Om de stukjes zonder infecties uit het riet te verkrijgen, werd de stengel eerst uitwendig met een mes goed schoon geschraapt, en daarna over het geheele oppervlak met 5% alkoholische sublimaat-oplossing behandeld. Hierna werd met 96% alkohol afgespoeld, waarna de nog op den stengel aanwezige alkohol in brand werd gestoken. Deze bewerkingen werden eenige malen herhaald. Vervolgens werd met een steriel mes van de geheele stengeloppervlakte nog een dun laagje weggenomen en daarna werden zoowel in de breedte als in de lengte stukjes van den stengel afgesneden. De aldus verkregen stukjes riet werden in een steriele glasdoos opgevangen en gerangschikt. Op deze dwars- en lengtedoorsneden werden de chemicaliën, hetzij in vasten of opgelosten toestand, gebracht, terwijl enkele schijfjes en lengtedoorsneden voor contrôle onbehandeld bleven. Daarna werden de glasdoozen in een thermostaat bij 30° C. geplaatst. De ondervolgende Tabel XXIV geeft een overzicht van de gebezigde chemicaliën en de intensiteit van de roode verkleuring, die door deze werd bewerkstelligd. De beoordeeling geschiedde na 2 à 3 dagen.

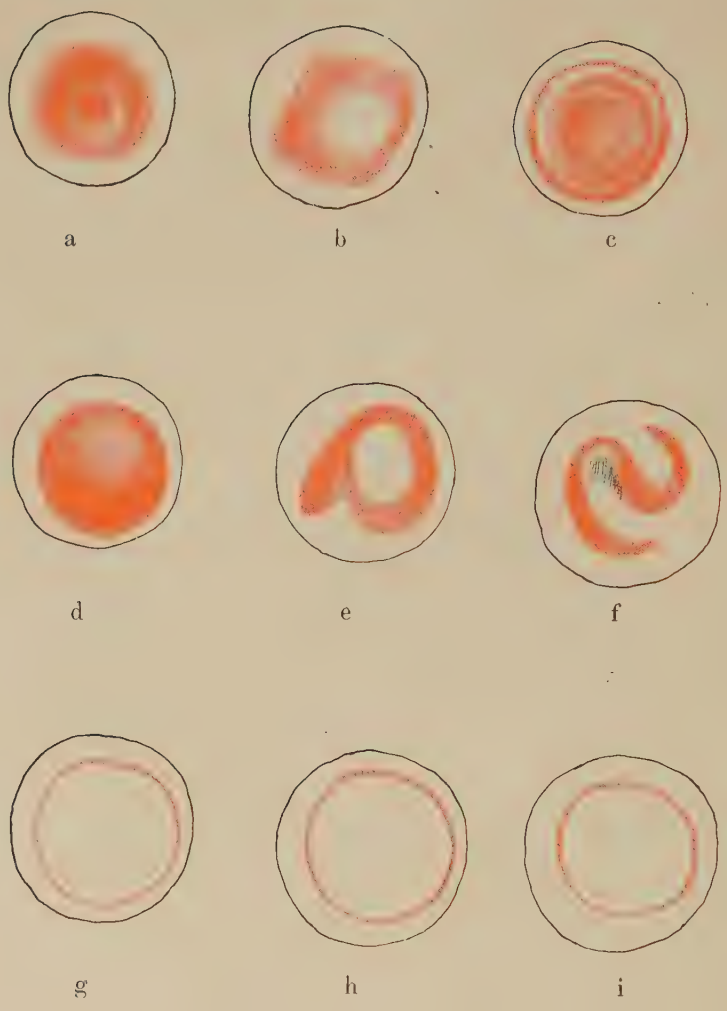

Fig. 13.

De roode verkleuring in dwarsdoorsneden van het suikerriet na ongeveer 3 dagen bij 30° C. (schematisch),

a. door Bact. herbicola (stam No. 2).
b. „ Bact. herbicola (rood klaverzaad).
c. „ Bact. polymyxa.
d. „ Mohr's-zout.
e. „ phenol (5 %).
f. „ kaliumhydroxyde (20 %).
g. *h*. *i* Contrôle-rietschijfjes.

TABEL XXIV.

OVERZICHT VAN DE INTENSITEIT DER ROODE VERKLEURING VAN DE RIETSTENGELSTUKJES ONDER INVLOED VAN VERSCHILLENDE CHEMICALIËN.

Chemische stoffen.	Intensiteit der roode verkleuring.
Sublimaat (5% en kristal)	sterk rood
Mohr's-zout (kristal)	sterk rood
Phenol (5%)	sterk rood
» (kristal)	sterk rood
Phosphorzuur (10%)	sterk rood
Boorzuur (kristal)	zeer zwak rood
Zwavelzuur (25%)	rood
Azijnzuur (10%)	zwak rood
Oxaalzuur (kristal)	rood
Appelzuur (gec. opl.)	rood
Wijnsteenzuur (kristal)	sterk rood
Kaliumhydroxyde (20%)	rood

Uit deze proefnemingen blijkt dus, dat verschillende chemische verbindingen in staat zijn de roode verkleuring bij het riet te weeg te brengen.

Bij de proef met sublimaat, waarbij deze stof als oplossing of kristal op een lengtedoorsnede van het riet werd gebracht, trad op de plaats, waar deze stof in hooge concentratie aanwezig was, geen roode kleur op. Deze verscheen alleen aan den rand van het diffusieveld van de sublimaat. De roode kleurstof wordt dus blijkbaar in het onder invloed van het sublimaat langzaam afstervende weefsel nabij den rand van het diffusieveld van deze verbinding gevormd, terwijl in het snel gedoode weefsel binnen het diffusieveld geen roode kleur verschijnt. Analoog verliep de proef met het 25% zwaveizuur.

Werden phenol, oxaalzuur en wijnsteenzuur in niet geconcentreerde oplossingen op stukjes riet gebracht, dan strekte de roode verkleuring hierop zich uit over het geheele diffusieveld. Indien dezelfde verbindingen echter in kristalvorm op het rietweefsel werden gebracht, vormde zich om het kristal eerst een meer of minder groot kleurloos veld en hieromheen een intensieve roode verkleuring. In overeenstemming met de sublimaatproef, wordt in het kleurlooze veld het weefsel snel gedood, zoodat de roode verkleuring uitblijft, terwijl hieromheen in het langzaam afstervende weefsel de roode kleurstof gevormd wordt.

Bij de proef met Mohr's-zout trad roode verkleuring ook op de plaats van het kristal op, omdat deze verbinding blijkbaar slechts weinig vergiftig is en het weefsel slechts langzaam doet afsterven.

De proef met 10% azijnzuur gaf om een kleurloos diffusieveld eenige roode vlekken en strepen te zien.

De proef met 20% kaliumhydroxyde gaf op de plaats, waar eenige druppels hiervan op het stukje riet waren gebracht, een sterke bruinroode verkleuring en hieromheen een rood veld. De blanco stukjes riet, welke als contrôle dienden bij de hierboven beschreven proeven, vertoonden na 2 à 3 dagen slechts een zwakken en smallen rooden zoom, dicht langs den omtrek. Deze is toe te schrijven aan de brandwond, veroorzaakt door den brandenden alkohol, gebruikt bij het steriliseeren van het buitenoppervlak van den rietstengel. De localisatie der roode verkleuring, zooals die bij deze proeven onder invloed van verschillende chemicaliën wordt aangetroffen, vindt men in de figuren 13 (d, e en f) en 14 b, c, d, e, f, g, en h) schematisch weergegeven.

Het mikroskopisch onderzoek van het roodgekleurde riet leerde nu, dat de roode kleurstof vooral voorkomt in de celwanden, terwijl daarnaast de aanwezigheid van roodgekleurde gommassa's in xyleem en phloëem kon worden vastgesteld.

Bij sterk roodgekleurde weefselstukjes is in dwarscoupes bij 50-voudige vergrooting en geheel geopend irisdiaphragma waar te nemen, dat zoowel de vaatbundels als de vaatbundelscheede sterk rood zijn gekleurd. Vooral de wanden der beide groote houtvaten, het spiraalvat en het ringvat zijn rood van kleur, terwijl binnen in de vaten paarsroode stukjes gom zijn waar te nemen. Ook het phloëem kan donkerpaars of donkerbruinrood tot rood verkleurd zijn. Bij een zwakke roode kleur van den vaatbundel is het phloëem soms lichtbruin van kleur, Het parenchymatisch weefsel, dat den rooden vaatbundel omgeeft, vertoont slechts een zwakke roode verkleuring in de celwanden.

Het mikroskopisch beeld van de met chemicaliën bewerkte roode verkleuring, vertoont in alle wezenlijke opzichten overeenstemming met dat van de verkleuringen, welke in serehziek riet werden aangetroffen. In beide gevallen variëert echter dit beeld aanmerkelijk, naarmate het proces meer of minder ver is voortgeschreden.

Het kwam mij voor van belang te zijn na te gaan, in hoeverre de aanwezigheid van luchtzuurstof van invloed is op het ontstaan

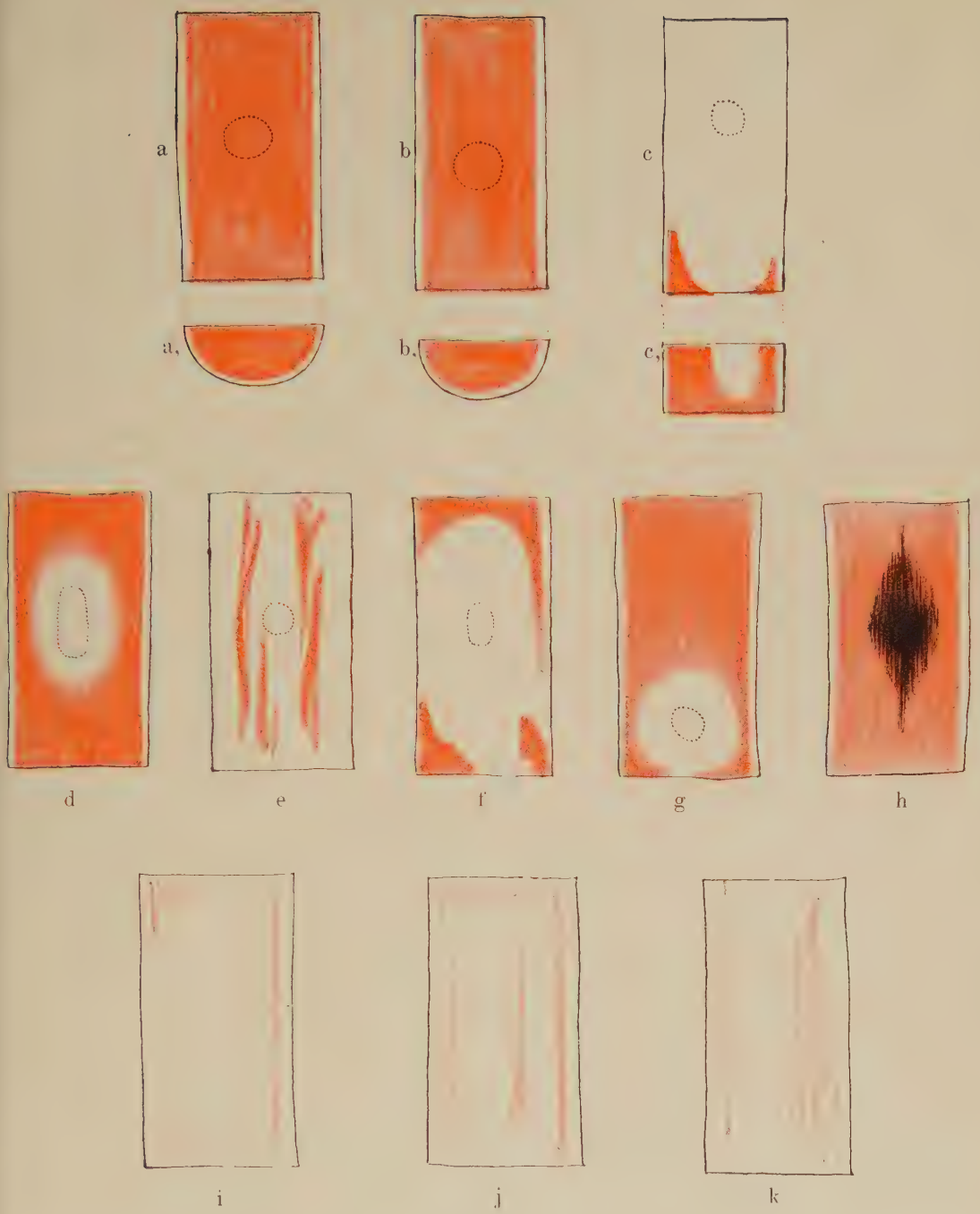

Fig. 14.

De roode verkleuring in lengtedoorsneden van het suikerriet na ongeveer 3 dagen bij 30° C. (schematisch),

a. door Bact. herbicola (stam No. 2). (*a*, dwarse doorsnede).
b. „ phenol (5 %) (*b*, „ „).
c. „ sublimaat (kristal) (*c*, „ „).
d. „ wijnsteenzuur (kristal)
e. „ azijnzuur (10 %).
f. „ zwavelzuur (25 %).
g. door phosphorzuur (10 %).
h. „ kaliumhydroxyde (20 %).
i, *j* en *k* contrôle-rietstukjes.

van de roode kleurstof. Daartoe werden wederom drie in de lengte gehalveerde stukjes rietstengel, waarop respectievelijk een kristal wijnsteenzuur, eenige druppels 5% phenol en eenige druppels 10% phosphorzuur, gebracht in een petrischaal, welke op haar beurt wederom was geplaatst in een hermetisch gesloten glasdoos. De petrischaal was omgeven door een rand van in alkalische pyrogallol gedrenkte watten[1]). Ter contrôle werden in de petrischaal bovendien twee onbehandelde rietstukjes gebracht, terwijl het geheel wederom bij 30° C werd geplaatst.

Na vier dagen was geen spoor van een roode verkleuring waar te nemen, terwijl, zooals wij boven zagen, deze tijdsduur ruim voldoende was om onder aërobe voorwaarden onder den invloed der gebruikte chemicaliën een intensieve roode verkleuring te doen intreden.

Na genoemd tijdsverloop werd de glasdoos geopend en nu trad reeds na twee dagen wederom de roode kleur op.

Op den 6den dag na de luchttoetreding was het stukje riet, waarop wijnsteenzuur was gebracht, geheel rood, behalve op de plek, waar het kristal lag; het stukje riet met 5% phenol vertoonde een roode verkleuring over de geheele oppervlakte, terwijl dat met 10% phosphorzuur zwakker rood getint was.

De contrôlestukjes vertoonden op dat moment slechts een smallen, zwak rooden zoom, op eenigen afstand van den omtrek gelegen.

De gevolgtrekking, welke uit deze proef gemaakt moet worden, is, dat luchtzuurstof onmisbaar is om de roode verkleuring in het langzaam afstervende weefsel te doen optreden.

Verder overtuigde ik mij ervan, dat het bij deze proeven noodzakelijk is, van levend suikerrietweefsel uit te gaan.

Rietstukjes, die door onderdompelen gedurende korten tijd in kokend water gedood waren, lieten zich op geenerlei wijze meer rood kleuren.

§ 4. *De roode verkleuring van het suikerriet opgevat als nekrobiotisch proces.*

De voorafgaande waarnemingen doen het nu zeer waarschijnlijk voorkomen, dat men de roode verkleuring van het suikerriet moet opvatten als een nekrobiotisch proces, dat in de langzaam

1) De gevolgde werkwijze kwam geheel overeen met die, welke door mij is aangegeven voor de anaërobe kultuur van mikro-organismen. Voor details zie men: Archief voor de Suikerindustrie in Ned-Indië, 1917, pag. 1132.

afstervende cellen verloopt. De gebruikte vergiften doen de cellen afsterven, zonder evenwel de daarin aanwezige enzymen te dooden. Tengevolge van de vernietiging der plasma-membranen diffundeeren deze enzymen naar buiten en onder deze bevindt zich een enzym, dat in tegenwoordigheid van zuurstof in staat is een kleurloos celbestanddeel in een roode oplosbare kleurstof om te zetten. De kleurstof diffundeert dan uit de parenchymatische cellen en wordt vervolgens in sterke mate door de celwanden geabsorbeerd. In het bijzonder in de dichtere wanden der houtvaten en van het sclerenchym wordt dan de verkleuring duidelijker waarneembaar.

Het geheel laat zich eenigermate vergelijken met de omzettingen, welke zich bij het langzaam afsterven der cellen in de bladeren van Indigofera tinctorium afspelen. Alleen met dit verschil, dat aldaar het kleurlooze substraat (het indikaan), in het celvocht opgelost aanwezig is, waardoor dit uit snel afgedoode bladeren door extractie te isoleeren is. Overeenkomstige proeven om een dergelijke scheiding van substraat en enzym ook voor het suikerriet te bewerkstelligen, hadden geen succes. Terwijl dus het optreden der roode kleurstof door de bovenstaande proefnemingen tot op zekere hoogte wordt verklaard, verdient het ook bij deze proeven geconstateerde verschijnsel der gomvorming nog even nader te worden besproken. Het feit, dat de gevormde gom, zoowel in het serehzieke als in het met chemicaliën behandelde rietweefsel zeer verschillende kleurnuances, van lichtgeel, bruin, rood tot violet vertoont, maakt het waarschijnlijk, dat de kleur van de gom wordt veroorzaakt, doordat de in het rietweefsel gevormde kleurstof door de gom wordt opgenomen. Dan rest nog slechts de vraag onder de oogen te zien, waaraan het ontstaan van de gom zelve is toe te schrijven. In § 4 van Hoofdstuk VIII wezen wij erop, dat het niet uitgesloten is, dat de z.g. gomvorming zou zijn terug te brengen tot de ontwikkeling van wandstof-produceerende bacteriën in vaatbundels. Dat, zooals wij hierboven zagen, gomvorming ook bij de proefnemingen met chemicaliën optreedt, is nu op zichzelf nog geenszins een bewijs, dat bedoelde opvatting onjuist zou zijn. Wel is waar vond bij deze proeven een zorgvuldige sterilisatie van het buitenoppervlak van den rietstengel plaats, terwijl tevens alle voorzorgen werden genomen om een infectie van buitenaf te voorkomen, maar ook voor het gebruikte uit de kassen afkomstige riet moet de waarschijnlijkheid groot geacht worden, dat in het inwendige van den stengel zich mikro-organismen bevinden. In dit verband moet er dan nog

op worden gewezen, dat deze proeven plaats hadden bij een voor de bacteriën-ontwikkeling doorgaans optimale temperatuur van 30° C., terwijl de gomvorming zich ook steeds eerst na omstreeks 2 dagen manifesteerde.

§ 5. *Verdere waarnemingen over de roode verkleuring van het suikerriet door mikrobenwerking.*

Het leek nu verder aangewezen na te gaan, in hoeverre de verschillende bacteriën, die blijkens de boven beschreven opzuigproeven een roode verkleuring van het suikerriet bewerkten, ook in staat waren dit te doen onder dezelfde voorwaarden als bij de proefnemingen met chemicaliën hadden geheerscht.

De ondervolgende Tabel XXV geeft een overzicht van de met verschillende bacteriën verkregen resultaten.

Tabel XXV.

Overzicht van de intensiteit der roode verkleuring van de rietstengelstukjes onder invloed van verschillende bacteriën.

Bacteriën.	Intensiteit van de roode verkleuring.
Bact. herbicola (stam No. 2)	donkerrood
Bact. herbicola (uit serehziek EK 28)	rood
Bact. herbicola (uit serehziek SW 3)	rood
Bact. herbicola (uit serehziek Zwart Cheribon)	rood
Bact. herbicola (rood klaverzaad)	rood
Aërobacter coli (uit grond)	rood
Aërobacter levans	rood
Aërobacter aërogenes (uit melk)	rood
Bac. polymyxa	donkerrood
Streptococcus dextranicus	donkerrood

De blancoproef met dwars- en lengtedoorsneden van het riet gaf na denzelfden tijd bij 30° C. slechts een zwakke roode verkleuring in den vorm van een smallen zoom langs den omtrek van het stukje riet te zien. Deze is toe te schrijven aan de reeds besproken oorzaak.

In fig. 13 treft men onder *a*, *b* en *c* en in fig. 14 onder *a* wederom een schematische voorstelling aan van de wijze, waarop de roode verkleuring in de rietschijfjes onder invloed der bacteriën optreedt.

§ 6. *Een onderzoek naar den aard van de door nekrobiose in het suikerriet gevormde roode kleurstof.*

Onderzoekingen over de in het kleurlooze celweefsel van het suikerriet onder bepaalde voorwaarden optredende kleurstoffen zijn verricht door Szymanski, Prinsen Geerligs en Langguth Steuerwald.

Szymanski [1]) isoleerde uit natuurlijk gestorven riet een roode kleurstof, waarvoor hij de oplosbaarheid in verschillende oplosmiddelen naging. Zijn waarnemingen over den aard van deze kleurstof leidden in hoofdzaak tot het negatieve resultaat, dat deze kleurstof niet behoorde tot de groep der phlobaphenen (oxydatieproducten van looizuur).

Prinsen Geerligs [2]) onderzocht in zijn studie over ampas de gele incrusteerende kleurstof, die bij behandeling van het riet met alkalisch reageerende vloeistoffen ontstaat. Daarbij sprak hij de meening uit, dat de onder meer door Szymanski onderzochte roode kleurstof door langzame oxydatie uit de gele incrusteerende kleurstof ontstaat. Ook Prinsen Geerligs komt tot de gevolgtrekking, dat de roode kleurstof niet tot de phlobaphenen kan worden gerekend.

Daar ook mijn proefnemingen (zie § 3 van dit hoofdstuk) aantoonden, dat voor de vorming van de roode kleurstof, zuurstof onmisbaar is, lijkt het wenschelijk, hier eveneens eenige aandacht te schenken aan de latere onderzoekingen over de bovengenoemde gele incrusteerende kleurstof. Door Langguth Steuerwald [3]) werd hieromtrent een uitvoerig onderzoek verricht, waarbij hij tot het resultaat kwam, dat de met alkaliën een gele verkleuring gevende stof tot de aromatische verbindingen moet worden gerekend. Bedoelde stof, door Steuerwald saccharetine genoemd, vertoont een zwak zure reactie, terwijl bij kalismelting protocatechuzuur en pyrocatechine ontstaan. Bij verwarming met minerale zuren worden vanillinezuur en vanilline afgesplitst. Steuerwald achtte het waarschijnlijk, dat de incrusteerende kleurstof een bestanddeel is van de in de celwanden voorkomende houtstof. Intusschen kon hij geen aanwijzingen vinden voor een ontstaan van de roode kleurstof bij oxydatie van het saccharetine.

Uit dit alles volgt, dat omtrent den aard van de bij nekrobiose in het suikerriet verkregen roode kleurstof nog zoo goed als niets

[1]) Bulletin Proefstation Kagok, No. 8.
[2]) Archief voor de suikerindustrie in Ned.-Indië. 1897, pag. 359.
[3]) Mededeelingen van het Proefstation voor de Java-suikerindustrie. 1911. No. 12, pag. 365.

met zekerheid vaststaat. Een eenigszins nader onderzoek scheen dus alleszins aangewezen. Hiertoe was het in de eerste plaats noodig een zekere hoeveelheid dezer stof te verzamelen. Hiervoor werden zoowel schijfjes als lengtedoorsneden uit den rietstengel in glasdoozen bij 30° C. geplaatst. Door spontane mikrobenvegetatie, vooral door schimmels, trad na omstreeks twee dagen bij de vochtige atmosfeer in de glasdoos de roode verkleuring van het riet in. Het zijn vooral de vaatbundels, die zich rood, bruin- of paarsrood kleuren, waardoor een dwarsdoorsnede meestal rooder van kleur is dan een lengtedoorsnede, terwijl de roode kleur bij den knoop en dicht aan den omtrek van den stengel, waar vele vaatbundels gelegen zijn, sterker is dan in het midden. Dit laatste wordt bij een dwarsdoorsnede goed waarneembaar, wanneer hiervan een dun laagje wordt weggesneden.

De roode verkleuring vangt meestal aan op de knoopen. Het geval kan zich zelfs voordoen, dat de knoopen reeds fraai rood zijn gekleurd, terwijl het tusschenliggende lid nog blank is. Kleurt ook deze zich langzamerhand rood, dan zijn de knoopen intusschen donkerder rood geworden.

Voor het verkrijgen der kleurstof werden de roode stukjes riet met water gekookt. Bij filtratie van de verkregen oplossing bleek, dat het filtreerpapier veel van de kleurstof opnam en zich daarbij blauwpaars kleurde. Het filtraat was lichter van kleur dan de oorspronkelijke oplossing. Van de eigenschap van de cellulose-vezel om de roode kleurstof op te nemen werd gebruik gemaakt om een zuivere waterige oplossing der kleurstof te bereiden, daar het gedroogde filtreerpapier bij koken wederom een groot gedeelte der roode kleurstof loslaat. Ook met warme 96% alkohol is de kleurstof uit het filtreerpapier te extraheeren.

Voor het verkrijgen eener waterige of alkoholische oplossing der roode kleurstof werd het afkooksel der roode stukjes riet in stukjes filtreerpapier opgezogen en daarna langen tijd met koud gedistilleerd water, onder voortdurende verversching, goed uitgewasschen. De blauwpaarsgekleurde stukjes papier werden na drogen met gedistilleerd water uitgekookt of met 96% alkohol op het waterbad gedigereerd. Na bezinking werd de heldere vloeistof afgekoeld of voorzichtig afgeschonken. Ook filtreeren der warme vloeistof gaf een roodgekleurd filtraat, waarmede verschillende reacties waren uit te voeren.

Na vergelijking met vele kleurstoffen werden de eigenschap-

OVERZICHT VAN DE EIGENSCHAPPEN VAN DE BIJ NEKROBIOSE

Eigenschappen	Alizarine	Purpuri Dr. G. GRÜB Co., Lei
Kleur der vaste stof	oranje	mat bruin
Kleur der verdunde waterige oplossing	roodviolet	rood
Oplosbaarheid in water	—	niet gemak
Kleur in absoluten alcohol . . .	geelbruin	oranjero
Oplosbaarheid in absoluten alcohol	goed	vrij gemak
Kleur in benzol	—	oranjero
Oplosbaarheid in benzol .	—	niet gemak
Kleur in aether	—	oranjege
Oplosbaarheid in aether . . .	geen	niet gemak
Lengte absorptieband in abs. alcohol	—	540—40
Lengte absorptieband in benzol .	—	540—40
Lengte absorptieband in aether . .	—	530—40
Oplosbaarheid in chloroform	geen	moeilij
Kleur in aluminiumchloride-oplossing (10%)	rood	rood
Oplosbaarheid in aluminiumchloride-oplossing (10%)	niet gemakkelijk	gemakke
Kleur in verdund zoutzuur (10%)	geel	verblee
Kleur in verdund kaliumhydroxyde (10%)	violet	wijnroo
Kleur op droog filtreerpapier . .	blauw	blauwpa
Kleur in verdunde calciumchloride-oplossing (10%) . . .	roodviolet	rood
Kleur in verdunde kopersulfaat-oplossing (10%)	roodviolet	violette ve ring en rood neersla
Toevoeging van verdund kaliumhydroxyde aan aluminiumchloride-oplossing.	rood lak	rood la
Fluorescentie der waterige oplossing	geen	wel
Reductie door Bact. coli	—	geen

[1]) SZYMANSKI. Bulletin Proefstation Kagok No. 8.
[2]) MURIEL WHELDALE. The anthocyaninpigments of Plants. 1916, pag.

ET GEVORMDE ROODE KLEURSTOF MET DIE VAN ALIZARINE

kleurstof uikerriet.	Aanteekening.
od (uit al- ingedampt)	SZYMANSKI [1]) omschrijft de kleur als matrood
rood	
emakkelijk	SZYMANSKI: niet oplosbaar
rood	
akkelijk	SZYMANSKI: vrij gemakkelijk
njerood	
emakkelijk	
oranje	
emakkelijk	SZYMANSKI: niet oplosbaar
—400 μ	Purpurine C. A. F. KAHLBAUM Adlershof. 535—400 μ
—400 μ	» » » 535—400 μ
—400 μ	» » » 530—400 μ
oeilijk	
rood	
akkelijk	
rbleekt	SZYMANSKI: rozerood
ijnrood	SZYMANSKI: intensief rood — de roode rietkleurstof vertoont dus geen anthocyaan-reactie [2])
uwpaars	
rood	
ette ver- euring neerslag	
od lak	
geen	
geen	

pen der roode rietkleurstof met die van alizarine en purpurine vergeleken, daar hiermede de meeste verwantschap werd waargenomen. Voor het onderzoek naar de oplosbaarheid van de rietkleurstof in verschillende oplosmiddelen, werd gebruik gemaakt van in filtreerpapier opgenomen kleurstof, na uitwassching en droging hiervan.

Om na te gaan of de rietkleurstof was te reduceeren tot een leuko-verbinding, werd Bact. coli gebracht in een voedingsvloeistof, waaraan de rietkleurstof was toegevoegd. Daartoe werd een stopfleschje geheel gevuld met een oplossing van de samenstelling:

Vleeschbouillon + roode kleurstof	100	c.c.
Glucose	3	G.
K_2HPO_4	0,05	»

Na infectie met Bact. coli werd het fleschje met de stop goed gesloten en bij 35° C. geplaatst.

De roode rietkleurstof in de vleeschbouillon werd verkregen door roodgeworden stukjes riet met vleeschbouillon uit te koken en dit extract, na toevoeging van glucose en kaliumphosphaat, te steriliseeren.

Tegelijkertijd werd eenzelfde proef ingezet, waarbij de kultuurvloeistof werd gekleurd met purpurine (Dr. G. Grübler & Co, Leipzig) en eveneens geënt met Bact. coli.

Als contrôle werd een derde fleschje gebruikt met dezelfde vloeistof als het tweede, echter zonder geïnfecteerd te zijn met Bact. coli. De kleur der vloeistoffen in de drie fleschjes was gelijk genomen.

Zelfs na meerdere dagen werd in geen der fleschjes ontkleuring waargenomen, ofschoon een krachtige gisting optrad, zoodat geen reductie tot een leuko-verbinding mogelijk bleek.

Ook hierin werd overeenkomst gevonden tusschen de roode rietkleurstof en purpurine. Wel werden beide kleurstoffen in waterige oplossing door natriumhyposulfiet ($Na_2S_2O_4$) ontkleurd.

Voor het spektroskopisch onderzoek werden purpurine en de roode rietkleurstof in eenzelfde oplosmiddel in nagenoeg gelijke concentratie onderling vergeleken.

De Tabel XXVI op p. 461 — 462 geeft een overzicht der waargenomen eigenschappen van de roode rietkleurstof, vergeleken met die van alizarine (1-2-dioxyanthrachinon) en vooral van purpurine (1-2-4-trioxyanthrachinon).

Uit Tabel XXVI blijkt nu dus inderdaad, dat er zeer groote overeenkomst bestaat tusschen de eigenschappen van de roode riet-

kleurstof en die van het purpurine. Wat de spektroskopische waarnemingen [1]) aangaat moet nog worden opgemerkt, dat het spektrum aan den kant van het violet geheel werd geabsorbeerd. De plaats echter, waar op de golflengteschaal de absorptieband aanvangt, is, zooals de lijst aangeeft, voor purpurine en de rietkleurstof in dezelfde oplosmiddelen, een weinig verschillend. Een dergelijk verschil werd door mij echter ook waargenomen bij oplossingen van purpurine van verschillende herkomst, zooals uit de lijst blijkt bij vergelijking der purpurine-praeparaten van Dr. G. Grübler & Co. te Leipzig en van C. A. F. Kahlbaum te Adlershof, zoodat uit het geringe verschil in lichtabsorptie tusschen purpurine en de roode rietkleurstof niet mag worden besloten, dat beide stoffen in samenstelling van elkander verschillen.

Ofschoon erkend moet worden, dat de bovenbeschreven waarnemingen geen absoluut bewijs leveren, dat de roode, bij nekrobiose in het suikerriet ontstane kleurstof inderdaad purpurine is, mag dit toch vrij waarschijnlijk worden geacht.

HOOFDSTUK XI.

Infectieproeven van suikerriet met reinkulturen van Bacterium herbicola.

§ 1. *De roode verkleuring der vaatbundels is geen specifiek symptoom der serehziekte.*

In Hoofdstuk IX werd met behulp van de z. g. opzuigproeven aangetoond, dat de aanwezigheid van Bact. herbicola in suikerriet aanleiding gaf tot het ontstaan van het meest op den voorgrond tredende symptoom eener beginnende serehziekte van genoemd gewas. In Hoofdstuk X is intusschen gebleken, dat dit symptoom, n.l. de roode verkleuring der vaatbundels, geenszins specifiek is voor genoemde ziekte, doch dat ditzelfde symptoom kan worden te voorschijn geroepen door tal van factoren, die aanleiding geven tot het langzaam afsterven der rietcellen.

Hoewel met dit feit vanzelfsprekend ten volle rekening moet worden gehouden, is hieraan aan den anderen kant evenmin een argument te ontleenen om Bact. herbicola niet als de verwekker der serehziekte te kenmerken. Slechts nadere proefnemingen konden hieraangaande een beslissing brengen en wel was het aangewezen,

[1]) Deze werden verricht met het rechtziend spektroskoop op universaalstatief van de firma Schmidt en Haensch.

experimenteel vast te stellen, of infectie van gezonde suikerrietplanten met een reinkultuur van Bact. herbicola naast het genoemde eerste symptoom, ook de verdere symptomen der serehziekte met zich bracht. Eerst indien dit het geval zou blijken, zou men het bewijs geleverd mogen achten, dat Bact. herbicola ook voldoet aan den 3den door SMITH geformuleerden eisch om een bepaald mikroorganisme als verwekker eener ziekte te mogen beschouwen.

§ 2. *Infectieproeven met reinkulturen van Bact. herbicola.*

Het teweegbrengen der infectie werd op verschillende wijzen beproefd.

1. Door in bladeren en jonge stengels der rietplanten met geïnfecteerde naalden te prikken. [1])
2. Door boorgaten in bijna volwassen rietstengels met geïnfecteerde wattenpropjes op te vullen.
3. Door bibits, al of niet met uitgeloopen spruiten, te infecteeren langs een booropening, dwars op de bibit nabij de spruit aangebracht.
4. Door bibits uit een stengel te snijden met een besmet kapmes, zooals door mej. G. WILBRINK [2]) werd toegepast bij haar onderzoek over de gomziekte.
5. Door opzuigproeven met bebladerde rietstengels, die daarna tot bibit werden versneden.

De methode van infectie, onder 1 aangegeven, leverde, niettegenstaande herhaalde pogingen, niet de minste resultaten op.

De infectie volgens 2 werd uitgevoerd aan een zestal gezonde, bijna volwassen stengels van de rietvariëteit 247 B. Daartoe werd in elken stengel onderin een dwarse booropening gemaakt ter diepte der halve stokdikte en deze opgevuld met steriele wattenpropjes, die vooraf gedrenkt waren in een reinkultuursuspensie van Bact. herbicola stam No. 2 in steriel water. Het boorgat werd daarna met paraffine zorgvuldig afgesloten.

Na 2 maanden werden op overlangsche doorsnede van één der stokken in twee knoopen, respectievelijk 15 en 30 c.M. van de infectie-opening verwijderd, enkele roode en roodachtig gele vaatbundels aangetroffen, die eenigszins op serehzieke vaatbundels geleken. De plant was echter niet in het minst serehziek. Verder kon uit de beide knoopen de ingebrachte mikrobe weer gemakkelijk geïso-

[1]) Zie E.F. SMITH, Bacteria in Relation te Plant Diseases, Vol. III, 1914, pag. 21.
[2]) l.c. pag. 1480.

leerd worden met behulp van een vloeistof- en plaatkultuur op moutgelatine.

De 5 andere planten vertoonden slechts een geringe roode verkleuring in den eerstvolgenden knoop boven de infectieplaats.

De infectiemethode volgens 3 gaf slechts in eenige gevallen een zwakke roode verkleuring in het stengeltje, doch de uitgroeiende planten werden niet serehziek. Voor het infecteeren werd in een bibitplantje van de rietvariëteit EK 28, loodrecht op de lengterichting der bibit op ongeveer 2 c.M. afstand van de spruit, met een kurkboor een gat geboord van bijna 1 c.M. diameter en omstreeks 2 c.M. diepte. Dit werd opgevuld met een dichte reinkultuursuspensie van Bact. herbicola uit een buiskultuur op moutagar van twee dagen oud. Daarna werd de opening gesloten met een stukje van het uitgeboorde rietcylindertje en aan de oppervlakte met paraffine dichtgesmolten.

De bibitinfectie, onder 4 genoemd, geschiedde met importbibit van de rietvariëteit EK 2.

Op een vooraf met sublimaatoplossing (1 : 1000) ontsmet en overvloedig met water afgespoeld kapblok werden eerst de contrôlebibits met een gedesinfecteerd kapmes gesneden en daarna de te infecteeren bibits, waarbij het kapmes rijkelijk werd bevochtigd met een suspensie van Bact. herbicola, afkomstig van een 2 dagen oude reinkultuur op moutagar (30° C.).

Ongeveer een uur na het snijden der bibit werden geïnfecteerde en contrôle-bibits met „bouillie bordelaise" behandeld en onmiddellijk daarna in den tuin uitgeplant. Dit geschiedde in twee naast elkander gelegen reeksen van vier vakken elk, die afwisselend met contrôle- en besmette bibits werden beplant. In elke plantgeul waren 15 bibits uitgelegd.

Zoowel de vakken met geïnfecteerde als met contrôle-bibits gaven na 12 maanden geheel gezonde, voordeelig opgegroeide planten, zoodat ook deze infectiewijze geen resultaten opleverde.

Met behulp van de in 5 genoemde opzuigproeven, uitgevoerd als in Hoofdstuk IX beschreven, werden jonge reinkulturen van Bact. herbicola in de rietstengels gebracht. Deze werden daarna tot bibits gesneden, zoodat men op deze wijze kunstmatig geïnfecteerde bibits heeft verkregen, die naast contrôle-bibits in de plantgeulen werden uitgeplant.

De infectieproeven, op deze wijze genomen, werden verricht met de rietvariëteiten 247 B en EK 28.

a. Kultuurproef met geïnfecteerde bibits van de rietvariëteit 247 B.

Het plantenmateriaal, dat voor deze proef diende, was afkomstig van een uit bergbibit geplanten maalriettuin van omstreeks 12 maanden oud, van de Sf. Pengkol, nabij het Proefstation gelegen.

Den 8sten Juli 1919 werden in de morgenuren de bebladerde rietstokken versch uit den tuin gesneden en op de reeds beschreven wijze zoo spoedig mogelijk aan de opzuigproef onderworpen.

Voor de infectie werd Bact. herbicola, stam No. 15 gebruikt, en wel ruim één dag oude buiskulturen op moutagar. Vóór den middag waren de bacteriënsuspensies geheel opgezogen. Den volgenden dag werden de geïnfecteerde rietstokken tot bibit gekapt. Uit één geïnfecteerden rietstok werden niet meer dan twee twee-oogsbibits gesneden, en wel uit het ondergedeelte van den stengel, daar deze uit den aard der zaak sterker geïnfecteerd waren dan het bovengedeelte.

Onmiddellijk nadat de geïnfecteerde rietstokken tot bibits waren versneden, werd tot het uitplanten hiervan overgegaan; tevens werden op denzelfden dag de benoodigde contrôle-stokken uit denzelfden tuin gesneden, op gelijke wijze als de geïnfecteerde stengels tot bibits gekapt en gelijktijdig met de geïnfecteerde bibits uitgeplant.

Voor de opzuigproef hadden 45 rietstengels gediend, welke dus 90 twee-oogsbibits opleverden. In elke plantgeul werden 15 bibits uitgelegd, zoodat voor de geïnfecteerde bibits 6 plantgeulen noodig waren, evenzoo voor de contrôle-bibits. Voorts was de plantproef zoo ingericht, dat de geulen met geïnfecteerde en die, met contrôlebibits beplant, elkander afwisselden.

Kort vóór het uitplanten werden zoowel de geïnfecteerde als de contrôle-bibits op de gebruikelijke wijze met „bouillie-bordelaise" behandeld,

Zes weken na den plantdatum stonden in verschillende geulen de planten, verkregen uit de geïnfecteerde-bibits, minder fraai dan de planten, gegroeid uit de contrôle-bibits in de naaste geulen, niettegenstaande alle geulen bij het water geven en de verschillende grondbewerkingen enz. geheel op dezelfde wijze werden behandeld. Naarmate het riet ouder werd, namen de verschillen tusschen de planten, ontstaan uit de geïnfecteerde en de contrôle-bibits, toe.

De proef werd op 9 Februari 1920, dus na zeven maanden, beëindigd. Het resultaat hiervan is in Tabel XXVIII samengevat.

Fig. 15.
Twee aangetaste planten (links) en twee gezonde contrôleplanten (rechts) uit de kultuurproef met geïnfecteerde bibits van de rietvariëteit 247 B. (Bact. herbicola stam No. 15).

Tabel XXVIII.

Overzicht van de uitkomsten van kultuurproeven met de suikerrietvariëteit 247 B, waarvan de bibits al of niet door opzuiging van een reinkultuursuspensie van Bact. herbicola waren geïnfecteerd.

Geul No. 1 (niet geïnfecteerd)	15 fraaie, gezonde planten.
Geul No. 2 (geïnfecteerd)	8 goede, gezonde planten. 2 „serehzieke" planten. 5 bibits dood.
Geul No. 3 (niet geïnfecteerd)	14 fraaie, gezonde planten. 1 bibit dood.
Geul No. 4 (geïnfecteerd)	9 gezonde planten. 2 „serehzieke" planten. 4 bibits dood.
Geul No. 5 (niet geïnfecteerd)	14 fraaie, gezonde planten. 1 spontaan serehzieke plant.
Geul No. 6 (geïnfecteerd)	9 fraaie, gezonde planten. 6 bibits dood.
Geul No. 7 (niet geïnfecteerd)	14 fraaie, gezonde planten. 1 bibit dood.
Geul No. 8 (geïnfecteerd)	5 goede, gezonde planten. 2 „serehzieke" planten. 8 bibits dood.
Geul No. 9 (niet geïnfecteerd)	15 fraaie, gezonde planten.
Geul No. 10 (geïnfecteerd)	10 goede, gezonde planten. 1 „serehzieke" plant. 4 bibits dood.
Geul No. 11 (niet geïnfecteerd)	15 fraaie, gezonde planten.
Geul No. 12 (geïnfecteerd)	7 gezonde planten. 1 „serehzieke" plant. 7 bibits dood.

Fig. 15 geeft een afbeelding van de twee aangetaste rietplanten (links), afkomstig uit geul 2 (geïnfecteerd), welke alle typische serehziekte-verschijnselen vertoonden. Daarnaast zijn twee gezonde rietplanten (rechts), afkomstig uit geul 1 (niet geïnfecteerd), afgebeeld

Fig. 16 geeft het inwendige ziektebeeld weer van de gedeeltelijk doorgesneden rietstengels van de in de vorige figuur afgebeelde „serehzieke" planten. De op de knoopen roodgekleurde vaatbundels zijn duidelijk waarneembaar.

Uit drie stokken van elk dezer planten werd met succes een her-isolatie van Bact. herbicola verricht, en wel bleek de daarbij verkregen kultuur alle belangrijke kenmerken met stam No. 15 gemeen te hebben.

b. Kultuurproef met geïnfecteerde bibits van de rietvariëteit EK 28.

Op geheel dezelfde wijze als met 247 B, werd op 10 Juli 1919 ook met de rietvariëteit EK 28 een infectieproef ingesteld. Het plantenmateriaal was afkomstig van een uit bergbibit beplanten maalrietttuin, eveneens van omstreeks 12 maanden oud, van de Sf. Pengkol.

Voor de infectie werden bij de opzuigproef gebruikt reinkulturen van Bact. herbicola, stam No. 16, van één dag oude buiskulturen op moutagar. Evenals bij de vorige proef, verliep ook hier het opzuigen der bacteriënsuspensies in den voormiddag. Den volgenden dag werden de aldus geïnfecteerde bibits gelijktijdig met de contrôle-bibits uitgeplant.

De verschillen, tusschen de planten uit de geïnfecteerde en de contrôle-bibits verkregen, waren bij deze proef sprekender dan bij de vorige, terwijl ook hier het aantal doode bibits opvallend was.

Op 6 Februari 1920, dus na bijna zeven maanden, werd de proef beëindigd. Het resultaat is in Tabel XXIX samengevat.

Tabel XXIX.

Overzicht van de uitkomsten van kultuurproeven met de suikerrietvariëteit EK 28, waarvan de bibits al of niet door opzuiging van een reinkultuursuspensie van Bact. herbicola waren geïnfecteerd.

Geul No. 1 (niet geïnfecteerd)	14 fraaie, gezonde planten.	1 bibit dood.
Geul No. 2 (geïnfecteerd)	10 „serehzieke" planten.	5 bibits dood.
Geul No. 3 (niet geïnfecteerd)	15 fraaie, gezonde planten.	

Fig. 16.

Gedeeltelijk doorgesneden stengels van één der aangetaste rietplanten uit de kultuurproef met geïnfecteerde bibits van de rietvariëteit 247 B. (Bact. herbicola, stam No. 15).

Geul No. 4 (geïnfecteerd)	6 gezonde planten. 2 „serehzieke" planten. 7 bibits dood.
Geul No. 5 (niet geïnfecteerd)	15 fraaie, gezonde planten.
Geul No. 6 (geïnfecteerd)	6 gezonde planten. 9 bibits dood.
Geul No. 7 (niet geïnfecteerd)	14 fraaie, gezonde planten. 1 plant sterk door boorders aangetast.
Geul No. 8 (geïnfecteerd)	3 gezonde planten. 2 „serehzieke" planten. 10 bibits dood.
Geul No. 9 (niet geïnfecteerd)	15 fraaie, gezonde planten.
Geul No. 10 (geïnfecteerd)	1 gezonde plant. 1 „serehzieke" plant. 13 bibits dood.
Geul No. 11 (niet geïnfecteerd)	15 fraaie, gezonde planten.
Geul No. 12 (geïnfecteerd)	7 „serehzieke" planten. 8 bibits dood.

Van twee willekeurige „serehzieke" planten werden van elk 4 stokken met behulp van vloeistof- en plaatkultuur onderzocht, teneinde den voor de infectie gebruikten stam van Bact. herbicola terug te isoleeren.

Deze proefnemingen verliepen geheel naar wensch. Er werd een dichte koloniënkultuur van Bact. herbicola verkregen, terwijl de eigenschappen van de aldus geïsoleerde bacterie op de verschillende voedingsbodems geheel met die van stam No. 16 bleken overeen te stemmen. [1])

§ 3. *Bespreking der resultaten van de infectieproeven.*

Wat het resultaat der infectieproeven volgens 5 aangaat mag dus eenerzijds wel worden vastgesteld, dat de gevolgde werkwijze

[1]) Terloops moge nog worden vermeld, dat ook met de bibits, welke met behulp van de opzuigmethode met andere bacteriën waren geïnfecteerd (zie Hoofdstuk X § 1), op geheel dezelfde wijze kultuurproeven waren verricht. Het resultaat was, dat het meerendeel der uit de geïnfecteerde bibits verkregen planten, evenals alle contrôle-planten een volkomen normale ontwikkeling vertoonden. Een aantal der geïnfecteerde bibits leverde evenwel typisch serehzieke planten op. In al deze gevallen kon echter uit de stengels wederom Bact. herbicola worden geïsoleerd.

aanleiding gaf tot het optreden van een wat verhoogd percentage aan „serehzieke" planten. Intusschen moet er dadelijk aan worden toegevoegd, dat van een slagen der infectieproeven geen sprake is. Daartoe is het aantal der ook na infectie gezond gebleven planten veel te hoog, terwijl het resultaat een ongedwongen verklaring zou kunnen vinden als men aanneemt, dat de voor de infectie toegepaste behandeling een verzwakking van de resistentie der plantenindividuen heeft veroorzaakt, met het gevolg, dat de onbekende, blijkens alle kultuurproeven in het laagland steeds aanwezige factoren, die het optreden der serehziekte bepalen, op de aldus verzwakte individuen vat hebben gekregen.

Mede in verband met het negatieve resultaat der infectieproeven volgens onder 1 tot 4 genoemde werkwijzen, kan de conclusie dan ook niet anders luiden, dan dat het optreden van de serehziekte in het suikerriet *niet* door de aanwezigheid van Bact. herbicola in dit riet wordt bepaald.

HOOFDSTUK XII.

Opmerkingen van Algemeenen aard over de serehziekte.

§ 1. *Beschouwingen over den invloed van uitwendige omstandigheden op het optreden der serehziekte.*

In overeenstemming met den aard der voorafgaande onderzoekingen ligt het niet in de bedoeling hier ter plaatse in een uitvoerige phytopathologische beschouwing in zake het wezen der serehziekte te treden.

De verkregen uitkomsten leiden er echter vanzelf toe eenige opmerkingen van algemeenen aard over de serehziekte te maken.

Het negatieve resultaat der in het vorige hoofdstuk beschreven infectieproeven toont duidelijk aan, dat de simplistische opvatting, dat het optreden der serehziekte uitsluitend zou worden bepaald door de aanwezigheid van Bact. herbicola in den rietstengel, onhoudbaar is.

Nu is evenwel in Hoofdstuk II er reeds op gewezen, dat in latere jaren de phytopathologen steeds meer tot de overtuiging zijn gekomen, dat voor het ontstaan eener parasitaire plantenziekte, behalve de parasiet, ook de dispositie van de voedsterplant een alleszins essentieele factor is. Dit inzicht is o. m. gebaseerd op het feit, dat vele der meest gevreesde plantenparasieten veelal ook in de

onmiddellijke omgeving van gezonde voedsterplanten zijn aangetroffen. Het al of niet optreden der betreffende ziekte wordt dus voor een belangrijk deel beheerscht door de mate van resistentie der verschillende individuen, resp. der variëteiten en soorten.

Terwijl tot dusver in dit verband uitsluitend wordt gewezen op de aanwezigheid van de betreffende parasieten in de onmiddellijke omgeving der plant, lijkt het geenszins uitgesloten, dat men in dit opzicht nog een stap verder kan gaan en zou mogen aannemen, dat ook de aanwezigheid van de parasiet in de plant nog geenszins altijd tot het optreden der ziekte zou behoeven te leiden. Deze veronderstelling wordt eenerzijds gesteund door mijn proefnemingen, waaruit overtuigend gebleken is, dat ook het inwendige van uiterlijk geheel normale planten, althans van het suikerriet, practisch nooit vrij van mikro-organismen is.

Anderzijds moge erop worden gewezen, dat volkomen analoge gevallen, waarbij pathogene mikro-organismen in geheel normale dierlijke organen zijn aangetroffen, reeds lang bekend zijn. [1])

Het logisch gevolg van deze zienswijze zou nu zijn, dat aan den 3den door Smith geformuleerden eisch niet langer met absolute gestrengheid zou kunnen worden voldaan.

In verband hiermede lijkt het nu loonend na te gaan, in hoeverre er aanwijzingen zijn, dat ook in het geval van de serehziekte bij het suikerriet de uiteenloopende resistentie der individuen van beslissende beteekenis is voor het ontstaan der ziekte.

Dat deze invloed zeker aanwezig is, mag op grond van de tallooze waarnemingen der onderzoekers, die zich met het sereh-vraagstuk hebben beziggehouden, buiten twijfel worden geacht.

Immers volgens de meening van vele deskundigen is juist op dit feit de beteekenis der op Java algemeen gebruikelijke voorziening der vlaktetuinen met bibit uit de bergtuinen gebaseerd. Men stelt zich daarbij voor, dat de in de bergbibittuinen heerschende optimale kultuurvoorwaarden den weerstand van het daarin gekweekte riet dermate opvoeren, dat de alomtegenwoordige parasiet niet in staat is de ziekte te verwekken. De uit dit riet verkregen bibit zou haar verhoogde resistentie dan in voldoende mate, althans aan de eerste generatie van het daaruit te kweeken vlakteriet meedeelen, om dit ook onder minder gunstige kultuurvoorwaarden voor het optreden van serehziekte voor een groot deel te vrijwaren.

---

1) Zie b.v. Ch. E Marshall. Microbiology. 3rd Edition, 1921, pag. 664.

Intusschen moet worden erkend, dat deze verklaring van het genoemde verschijnsel niet de eenig mogelijke is. Het is b.v. ook denkbaar, dat het in de bergbibittuinen gekweekte riet gezond blijft tengevolge van het ontbreken van de parasiet, of tengevolge van het feit, dat de aldaar heerschende kultuurvoorwaarden direct, dus zonder den omweg van de verhoogde resistentie van de rietplanten, de ontwikkeling van de parasiet beletten [1]. Dat de eerste generatie van uit dit bergriet in de vlakte gekweekte planten doorgaans eveneens vrij van serehziekte is, zou in dezen gedachtengang kunnen zijn toe te schrijven aan de mogelijkheid, dat voor het ontstaan der serehziekte een reeds bij het snijden van de bibit intredende infectie zou worden vereischt.

Om deze reden zou dus de belangrijke rol der resistentie van de rietplanten eerst afdoend gedemonstreerd worden, wanneer het gelukte aan te toonen, dat men, uitgaande van ongetwijfeld geïnfecteerde bibit onder voorwaarden, waarvan vaststaat, dat zij op zichzelf voor de ontwikkeling van de parasiet alleszins gunstig zijn, door het verschaffen van optimale kultuurvoorwaarden voor de rietplanten, deze geheel normaal kan opkweeken.

Hier en daar wordt in de literatuur gewag gemaakt van enkele op zichzelf staande proefnemingen, waarbij uit zwaar serehzieke bibits in het laagland onder optimale kultuurvoorwaarden een belangrijk percentage aan gezonde planten werd verkregen; o.a. wordt hieromtrent in 1890 reeds iets door BENECKE [2]) meegedeeld.

Het leek mij intusschen gewenscht mij persoonlijk nog eens te overtuigen van de juistheid der waarnemingen, dat men uit serehzieke bibit onder bepaalde gunstige voorwaarden uiterlijk geheel normaal riet kan verkrijgen en daarbij tevens het al of niet verdwijnen van Bact. herbicola in de aldus verkregen rietplanten na te gaan.

§ 2. *Proefnemingen over het kweeken van geheel normaal riet uit serehzieke bibit.*

Onderstaande proefnemingen hadden dus ten doel na te gaan, in hoeverre het mogelijk is uit serehzieke bibit in het laagland door toepassing van optimale kultuurvoorwaarden van het riet, m.a.w.

---

[1]) Men denke b.v. aan de temperatuur, die in de bergbibittuinen aanmerkelijk beneden die der vlaktetuinen blijft.

[2]) F. BENECKE. Is het mogelijk uit typische „serehstekken" gezond suikerriet te telen? Naar aanleiding eener proef, genomen door Dr. L. OSTERMANN. Mededeelingen van het Proefstation „Midden-Java" te Semarang, 1890.

door opvoering van de resistentie van dit riet, te komen tot geheel normale rietplanten.

Alle aanplantingen werden verricht op een in de onmiddellijke nabijheid van het Proefstation gelegen terrein, dat uit zwaren kleigrond bestond. Teneinde hierin optimale kultuurvoorwaarden te scheppen, werd allereerst groote aandacht besteed aan een sterke aëratie van den bodem. Daartoe werden op de gebruikelijke wijze geulen gegraven volgens het Reynoso-systeem. Alvorens nu tot uitplanten over te gaan, liet ik den aldus bewerkten grond ruim zes weken aan zichzelf over. Onder den invloed van de zonnewarmte barstte de kleigrond ten slotte in zeer kleine kruimels uiteen, zoodat hierdoor een krachtige aëratie werd bereikt. Voor het overige werd zorg gedragen, dat gedurende het geheele verloop der proefnemingen de gewenschte vochtigheidstoestand van den grond werd gehandhaafd. Daartoe was het proefterrein omgeven door een drainagegoot, die, naar gelang van den regenval, meer of minder diep werd gehouden. Voorts werd zwavelzure ammoniak in de gebruikelijke hoeveelheid van 6 picol per bouw toegediend. Op gezette tijden werden verdroogde oudere bladeren verwijderd, terwijl de grond tusschen de rietplanten werd losgewerkt en van onkruid vrijgehouden.

Eerste proefneming. Rietvariëteit Tjepiring 24, afkomstig van de Sf. Tjomal.

Uit een zestal ingezonden serehzieke rietstokken werd een zestal bibits gesneden. Deze werden op 8 Mei 1918 uitgeplant. Hieruit ontwikkelden zich zes planten, welke 30 Augustus 1919, dus na ruim 15 maanden, werden gesneden.

Bij geen der planten waren toen serehsymptomen meer waar te nemen. De lengte der stokken variëerde tusschen 2,54 en 2,90 M., de dikte tusschen 2,2 en 2,9 c.M.

Bij onderzoek bleken de stokken voor het grootste gedeelte inwendig geheel normaal te zijn. Slechts in enkele gevallen werden op sommige knoopen hier en daar nog roode vaatbundels aangegetroffen. Van elk der zes planten werden twee stokken op de gebruikelijke wijze op de aanwezigheid van Bact. herbicola onderzocht, en wel werd van iederen stok aan boven- en onderkant een monster genomen. Het resultaat van dit onderzoek was het volgende.

Plant No. 1.	Van	2	onderzochte stokken			2	geïnfecteerd	met	Bact.	herbicola
» » 2.	»	2	»	»		1	»	»	»	»
» » 3.	»	2	»	»	geen		»	»	»	»

Plant No. 4. Van 2 onderzochte stokken geen geïnfecteerd met Bact. herbicola
» » 5. » 2 » » geen » » » »
» » 6. » 2 » » 1 » » » »

In 8 van de 12 stengels was dus Bact. herbicola niet meer aan te toonen.

Korten tijd te voren werd van elk der 6 planten wederom een enkele twee-oogsbibit uitgeplant. Dit geschiedde op 23 Juli 1919, terwijl de verkregen planten op 26 Juni 1920 gesneden werden. De planten hadden respectievelijk 7, 6, 6, 5, 7 en 12 mooie, inwendig geheel normale stokken opgeleverd. De lengte daarvan bedroeg gemiddeld 2,5 M., terwijl de dikte (in het midden gemeten) 2,7 c.M. bleek.

Bij het bacteriologisch onderzoek kon in geen enkel der 12 stokken Bact. herbicola meer worden aangetoond.

Tweede proefneming. Rietvariëteit Tjepiring 24, afkomstig van de Sf. Madjenang.

Op 19 Juni 1918 werd door bovengenoemde fabriek een twaalftal stokken ingezonden.

Inwendig vertoonden deze op de knoopen duidelijk het serehziektebeeld van de roode vaatbundels; alleen in enkele der bovenste geledingen waren de knoopen nog vrij normaal. Het meerendeel der 2 à 2,5 M. lange stokken had op de knoopen radiaal uitgeloopen worteloogen. De planten waren afkomstig van een zwaren, donkeren kleigrond, die onvoldoend uitgezuurd was. In al deze serehzieke stokken kon Bact. herbicola op de gebruikelijke wijze gemakkelijk worden aangetoond.

Den 22sten Juni 1918 werden uit de duidelijk zieke gedeelten 7 bibits gesneden en uitgeplant. De verkregen planten werden op 9 Augustus 1919 gesneden. Deze planten waren alle goed uitgestoeld, terwijl de stokken gemiddeld een lengte van 2 M. en een dikte van 3 c.M. hadden. De onderste leden waren ongeveer 10 c.M. en die nabij den top 2,5 c.M. lang. De stokken waren inwendig over het algemeen normaal. Slechts sporadisch kwamen rose knoopen met enkele verdachte roode vaatbundels voor.

Van elk der planten werden weer twee stokken op de gebruikelijke wijze op de aanwezigheid van Bact. herbicola onderzocht. Slechts in 2 van de 7 planten werd Bact. herbicola aangetroffen.

Korten tijd te voren werd van elk dezer 7 planten wederom één twee-oogsbibit gesneden. Het uitplanten geschiedde op 23 Juni 1919; de proef werd beëindigd op 22 Juni 1920.

De 7 bibits hadden 7 zeer fraaie planten opgeleverd, die achtereenvolgens 5, 5, 5, 6, 5, 5, 4 stokken hadden gevormd van gemiddeld 2,6 M. lang en 2,6 c.M. dik, die alle recht, cylindrisch van vorm en inwendig geheel normaal waren.

Bij het bacteriologisch onderzoek, op de gebruikelijke wijze verricht, kon Bact. herbicola in de onderzochte stokken niet meer worden aangetoond.

Derde proefneming. Rietvariëteit 2714 POJ, afkomstig uit den tuin van het Proefstation te Pasoeroean.

Van een aantal in den tuin aangetroffen duidelijk serehzieke planten werden uit aangetaste stengels twaalf twee-oogsbibits gesneden, nadat in deze stengels Bact. herbicola op de gebruikelijke wijze was aangetoond. De bibits werden 23 Juli 1919 uitgeplant, terwijl de verkregen planten op 1 Juli 1920 werden gesneden. De 12 uitgeplante bibits hadden 12 fraaie rietplanten opgeleverd met dikke, inwendig geheel normale stengels, welke gemiddeld 2,4 M. lang en 3,3 c M. dik waren. Gemiddeld hadden de rietplanten ieder drie stokken voortgebracht. Bij onderzoek bleek, dat in nog slechts één van de 24 stokken Bact. herbicola kon worden aangetoond.

Vierde proefneming. Rietvariëteit 139 POJ, afkomstig van de Sf. Sedajoe.

Door bovengenoemde fabriek werden op 14 Mei 1918 vier stokken van de rietvariëteit 139 POJ ingezonden. Drie van deze stokken waren reeds rottend en inwendig voos, zoodat ze ongeschikt waren voor bacteriologisch onderzoek. De vierde stok vertoonde op de knoopen het typisch serehziektebeeld van de roode vaatbundels. In dezen stok kon Bact. herbicola wederom worden aangetoond. Uit dezen stok werd één enkele twee-oogsbibit gesneden, welke op 15 Mei 1918 werd uitgeplant. Hieruit ontstond een plant met de abnormaal sterke uitstoeling van 37 stokken. Bij het einde der proefneming op 11 Aug. 1919 waren deze stokken gemiddeld 2,5 M. lang en 3 c.M. dik. Bij doorsnijden bleken de 37 stokken inwendig over het algemeen geheel normaal. Intusschen kwamen enkele stokken voor, die op de knoopen, ofschoon in geringe mate, roode vaatbundels vertoonden. Van deze min of meer verdachte stokken werden er 6 op de gebruikelijke wijze op de aanwezigheid van Bact. herbicola onderzocht. Hiervan was in twee gevallen het resultaat negatief, doch uit de andere 4 konden krachtige kulturen van Bact. herbicola worden verkregen.

Vijfde proefneming. Rietvariëteit 1499 POJ, afkomstig van de Sf. Winongan.

Door genoemde fabriek was een rietpol ingestuurd, waarvan de stengels zeer dun waren. Ze vertoonden voorts op lengtedoorsnede de typische serehknoopen, terwijl Bact. herbicola gemakkelijk kon worden aangetoond. Van deze serehzieke plant werden 23 Augustus 1919 vijf twee-oogsbibits gesneden en uitgeplant. De daaruit verkregen planten waren niet fraai en hadden respectievelijk 7, 10, 10, 1 en 13 stokken. Bij de beëindiging van de proef op 15 Juli 1920 waren deze gemiddeld 2,5 M. lang en 2,3 c.M. dik. Inwendig vertoonden de knoopen veelal nog een lichtroode kleur, terwijl hier en daar verspreid in het overige stengelgedeelte nog roode vaatbundels voorkwamen. Zooals op grond hiervan te verwachten was, kon in dergelijke knoopen Bact. herbicola worden aangetoond.

Zesde proefneming. Rietvariëteit 2560 POJ, afkomstig van de Sf. Lestari.

Een aantal door deze fabriek ingezonden stokken vertoonde het typische serehbeeld. De stengelleden waren kort, de uitgeloopen worteloogen tot een vilt vergroeid, terwijl het inwendig onderzoek leerde, dat de knoopen doortrokken waren van roode vaatbundels. In de serehzieke knoopen kon Bact. herbicola op de gebruikelijke wijze worden aangetoond.

Uit deze stokken werden tien twee-oogsbibits gesneden, die op 28 Mei 1918 werden uitgeplant. De daaruit verkregen planten zagen er gedurende de geheele groeiperiode ziekelijk uit. De stokken waren bij de beëindiging van de proefneming op 19 Augustus 1919 gemiddeld 1,5 M. lang en 2,2 c.M. dik. Van alle 10 planten vertoonden de knoopen duidelijk serehzieke vaatbundels. Bact. herbicola kon wederom in alle stokken op de gebruikelijke wijze worden aangetoond. Van deze serehzieke planten werden opnieuw twaalf twee-oogsbibits gesneden en op 23 Juli 1919 uitgeplant. De twaalf verkregen planten vertoonden respectievelijk een uitstoeling van 15, 5, 3, 7, 7, 4, 7, 8, 2, 4, 9 en 4 stokken.

Bij de beëindiging der proef op 7 Juli 1920 waren deze stokken gemiddeld 2,2 M. lang en 2 c.M. dik. Bij doorsnijden van de stengels bleken ook deze nog duidelijk serehziek te zijn. In overeenstemming hiermede kon Bact. herbicola in alle der onderzochte stengels worden aangetoond.

Overziet men thans het geheel der verkregen uitkomsten, dan mag op grond van het sprekende resultaat der eerste drie proefnemingen worden besloten, dat het inderdaad mogelijk is door het verschaffen van optimale kultuurvoorwaarden de resistentie van de te kweeken rietplanten zoo hoog op te voeren, dat zich uit geïnfecteerde bibits practisch zonder uitzondering normale, serehvrije rietplanten ontwikkelen.

Bij de vierde proefneming is dit resultaat niet geheel bereikt, doch trad ongetwijfeld een wijziging ten goede in den toestand van de gekweekte plant, in vergelijking met dien van de bibit in.

De beide laatste proefnemingen leeren evenwel, dat bij sommige rietvariëteiten de verbetering der kultuurvoorwaarden, althans in één of twee generaties, niet zoover is door te voeren, dat de ziekte daardoor afdoend wordt onderdrukt.

Ten slotte moge er nog op worden gewezen, dat ook bij deze proefnemingen het serehsymptoom der roode vaatbundels volmaakt parallel ging met het voorkomen van Bact. herbicola in de betreffende stengels.

§ 3. *Slotbeschouwing.*

Het feit, dat bij de in de vorige paragraaf beschreven proefnemingen in bepaalde gevallen door het scheppen van gunstige kultuurvoorwaarden van het riet, uit serehzieke bibit geheel normale planten konden worden verkregen, kan zijn verklaring niet vinden in het ontbreken van een eventueel de serehziekte veroorzakende parasiet; evenmin kan dit worden toegeschreven aan directe, voor de ontwikkeling van een dergelijken parasiet in het suikerriet minder gunstige factoren, zooals in het geval der bergbibittuinen nog denkbaar is.

Immers alle proefnemingen geschiedden op éénzelfde beperkt terreinstuk, waarin blijkens het optreden van serehzieke planten in andere der beschreven gevallen een eventueel bestaande parasiet zeker aanwezig was en zijn schadelijke werking kon uitoefenen.

Wanneer men dit overweegt, moet men dus onvermijdelijk concludeeren, dat het uitbreken van de serehziekte, hetzij geheel, hetzij in belangrijke mate, wordt beheerscht door den physiologischen toestand van de rietplant, in laatste instantie dus door de meerder of minder gunstige kultuurvoorwaarden.

In de eerste plaats wordt hiermede dus erkend, dat mijn proefnemingen geen afdoende bewijsgronden hebben opgeleverd om de

mogelijkheid van de hand te wijzen, dat de serehziekte, zooals dit o.m. door WAKKER werd aangenomen, een niet-parasitaire, dus z.g. physiologische ziekte zou zijn. Op grond van mijn proefnemingen moet men dan evenwel in deze veronderstelling aannemen, dat de factoren, welke deze physiologische verzwakking van de rietplant veroorzaken, mede ten gevolge hebben, dat gunstige ontwikkelingsconditiën voor Bact. herbicola in den zieken rietstengel worden geschapen. En dan blijft het nog denkbaar, dat enkele der thans als kenmerkend beschouwde symptomen der serehziekte slechts een gevolg zijn van het secundaire verschijnsel der ontwikkeling van Bact. herbicola in den rietstengel.

Een bevestiging voor de opvatting der niet-parasitaire natuur van de serehziekte, alsmede een beslissing aangaande de rol, die door Bact. herbicola in de natuurlijke serehziektegevallen wordt gespeeld, zou slechts zijn te verkrijgen, indien men erin zou slagen, suikerriet onder volledig aseptische voorwaarden groot te brengen. Eerst indien ook bij dergelijk riet door ongunstige kultuurvoorwaarden serehziekte-verschijnselen konden worden teweeggebracht, zou de beslissing ten gunste van de niet-parasitaire natuur van de serehziekte zijn gevallen, terwijl dan tevens zou kunnen worden uitgemaakt, in hoeverre slechts door infectie met Bact. herbicola het volledige serehziektebeeld zou worden verkregen.

In de tweede plaats is het evenwel geenszins uitgesloten, dat de invloed van den physiologischen toestand van de rietplant het optreden der serehziekte niet in zoo absolute mate beheerscht als in het voorafgaande mogelijk werd geacht. Wel is de invloed van dezen factor ongetwijfeld in niet onbelangrijke mate aanwezig, maar het blijft alleszins mogelijk, dat daarnaast voor het optreden der serehziekte de aanwezigheid van een tweeden factor, n.l. van een serehparasiet, moet zijn gerealiseerd. Ook bij aanwezigheid van een parasiet in de plant, in het bijzonder waar dit de aanwezigheid in doode weefselelementen, zooals de houtvaten, geldt, zal dan het optreden der ziekteverschijnselen kunnen uitblijven, indien de physiologische toestand van de plant, of in andere bewoordingen, haar resistentie, de ontwikkeling van de parasiet verhindert.

Indien men toch de opvatting van de parasitaire natuur van de serehziekte wil handhaven, laten de eerste drie der in de vorige paragraaf beschreven proefnemingen eèn andere verklaring niet toe.

Met dit gezichtspunt voor oogen is theoretisch de mogelijkheid niet te verwerpen, dat de in het serehzieke riet ten allen tijde door

mij aangetoonde Bact. herbicola de bewuste parasiet der serehziekte zou zijn. Het grootendeels negatieve resultaat der in Hoofdstuk XI beschreven infectieproeven zou zijn oorzaak *kunnen* vinden in de omstandigheid, dat in den strijd van den parasiet met de weerstandbiedende invloeden, welke van de bij de infectie gebruikte rietplanten uitgingen, de parasiet het onderspit heeft gedolven, met het resultaat, dat de typische ziekteverschijnselen uitbleven.

Volmondig wordt echter erkend, dat zulks niet waarschijnlijk is, daar het niet te begrijpen is, dat zelfs wanneer men rekening houdt met de bij de proefplanten toegepaste, zeker gunstige, kultuurvoorwaarden, de resistentie dier proefplanten tot zulk een hoogte zou zijn opgevoerd, dat daaruit het geringe percentage der geslaagde infecties zou zijn te verklaren.

Er rest dan nog slechts te wijzen op een laatste mogelijkheid, n.l. dat voor het tot stand komen der serehziekte, de aanwezigheid van een geheel ander mikro-organisme, hetwelk in de door mij gebruikte kultuurmedia zich in het geheel niet ontwikkelt, een onmisbare voorwaarde is. In dit verband zij eraan herinnerd, dat juist in de laatste jaren eenige gevallen bekend zijn geworden, waarin dierlijke mikro-organismen als verwekkers van plantenziekten zijn erkend.[1]) Voor dergelijke mikro-organismen, evenals trouwens voor vertegenwoordigers uit tal van groepen van plantaardige mikroben is het zelfs waarschijnlijk, dat zij in de door mij gebruikte „weelderige" kultuurmedia niet tot ontwikkeling komen.

Maar ook, indien het toekomstig onderzoek de juistheid van deze hypothese zou aantoonen, zal er alleszins aanleiding bestaan om volop aandacht te schenken aan de rol, welke door de in het natuurlijke serehzieke riet immer aanwezige Bact. herbicola wordt vervuld bij het tot stand komen der typische serehverschijnselen.

Overzicht der resultaten.

De uitkomsten van de in de voorafgaande hoofdstukken beschreven proefnemingen laten zich als volgt samenvatten:

1. Er werd een methode aangegeven, volgens welke het mogelijk is uit rietstengels perssap te verkrijgen op zoodanige wijze, dat infectie van buitenaf wordt uitgesloten. Deze methode berust op het onder aseptische voorwaarden uitboren van cylindertjes

1) Zie b.v. G. Stahel. De infectieproef in de phytopathologie 1921, en B. T. Palm. De mozaïkziekte van de tabak een chlamydozoonose? Bulletin van het Deli-proefstation No. 15, 1922.

uit het inwendige van rietstengels en het daarop volgende uitpersen dier cylindertjes in een speciaal daartoe geconstrueerd persje.

2. De onder 1 beschreven methode werd toegepast voor het onderzoek naar de aanwezigheid van mikro-organismen in uiterlijk normaal, zoowel als in serehziek suikerriet. Hiertoe werd het verkregen perssap op daartoe geschikte vaste voedingsbodems uitgestreken of met insgelijks passende kultuurvloeistoffen vermengd.
3. In dit laatste geval werd het eventueel in de onder 2 genoemde kultuurvloeistoffen verkregen mikrobenmengsel ontward, door dit mengsel vervolgens op vaste voedingsbodems te kultiveeren. In het belang van de diagnose der daarbij verkregen organismen werd door mij een werkwijze aangegeven, welke het practisch uitvoerbaar maakt, ook in het tropische klimaat deze organismen op gelatine te kweeken.
4. Het desbetreffend onderzoek van 591 uiterlijk geheel normale rietstengels, afkomstig uit zeer verschillende bibittuinen op Java, had tot resultaat, dat in nagenoeg alle gevallen de rietstengels verschillende saprophytische bacteriën bleken te bevatten. Slechts in een zestal stengels van verschillende rietvariëteiten, alle afkomstig van een op 3000 voet hoog gelegen bibittuin, werden geen mikro-organismen aangetroffen.
5. Een volgens dezelfde methode verricht onderzoek naar de mikroflora, aanwezig in de stengels van serehzieke rietplanten, bracht de constante aanwezigheid van een bepaalde bacteriesoort aan het licht.
6. Een uitgebreid onderzoek naar de eigenschappen van de in de stengels van serehzieke rietplanten ten allen tijde aangetroffen bacteriesoort toonde aan, dat deze identiek is met, of althans zeer nauw verwant is aan de door Burri en Düggeli onder den naam van Bacterium herbicola aureum beschreven bacterie.
7. Aangetoond werd, dat bij het kweeken van rietplantjes uit serehzieke bibit gelijktijdig met het optreden der roode verkleuring van de vaatbundels in de rietstengeltjes ook de bewuste bacterie daarin zijn intrede doet.
8. Opzuiging van een reinkultuursuspensie van de uit serehziek riet geïsoleerde bacterie in geheel normale rietstengels heeft ten gevolge, dat daarin het symptoom eener beginnende serehziekte, n.l. het optreden eener roode verkleuring der vaatbun-

dels, ontstaat. Op verschillende wijzen teweeggebrachte infecties van jonge rietplanten en bibits met de bewuste bacterie hadden evenwel niet tot resultaat, dat ook de verdere verschijnselen der serehziekte in de rietplanten te voorschijn werden geroepen.

9. Een nader onderzoek leerde, dat ook opzuiging van reinkultuursuspensies van verschillende andere bacteriën een roode verkleuring der vaatbundels in normale suikerrietstengels veroorzaakte.
10. Bij de verdere bestudeering van het verschijnsel der roode verkleuring der vaatbundels bleek, dat dit ook door tal van meer of minder giftige chemische verbindingen kon worden teweeggebracht. Dit leidde ertoe, deze roode verkleuring terug te brengen tot een nekrobiotisch proces, dat zich in de afstervende weefselelementen van den stengel afspeelt, gevolgd door een absorptie van de daarbij gevormde roode kleurstof door de celwanden. Voor de vorming der roode kleurstof bleek de aanwezigheid van zuurstof een onmisbare factor te zijn.
11. Een voorloopig onderzoek naar de door nekrobiose in den rietstengel gevormde kleurstof maakte het waarschijnlijk, dat deze kleurstof identiek is met, of nauw verwant aan, purpurine (1-2-4-trioxyanthrachinon).
12. In aansluiting op de waarnemingen van vroegere onderzoekers werd nogmaals gewezen op den grooten invloed, die zonder twijfel door de mate van resistentie van de rietplant, in laatste instantie dus door meer of minder gunstige kultuurvoorwaarden, op het al of niet intreden der serehziekte wordt uitgeoefend. Daartoe ingestelde proefnemingen bewezen, dat onder optimale kultuuromstandigheden uit zwaar serehzieke bibits in vele gevallen uiterlijk geheel normale rietplanten waren te kweeken. Daarbij werd nog vastgesteld, dat tegelijkertijd met het wegblijven der serehsymptomen ook de in de oorspronkelijke bibits steeds aanwezige Bact. herbicola in de betreffende planten niet meer was aan te toonen.

LIJST DER FIGUREN.

Fig. 1. Schematische voorstelling van het verloop van het vaatbundelstelsel in bibit en spruit. De figuur geeft den samenhang der vaatbundels weer bij een door serehziekte aangetaste bibit; de roode lijnen stellen de verkleurde vaatbundels voor.

Fig. 2. Uitgeboorde stukken rietstengel, welke achterblijven bij de aseptische monsterneming.

Fig. 3. Open pers.

Fig. 4. Gesloten pers.

Fig. 5. Gesloten pers. Omgelegd.

Fig. 6. Bacterium herbicola. Stam No. 2. Ciliën.
Lineaire vergrooting: 600×.

Fig. 7. Bacterium herbicola. Rood klaverzaad. Ciliën.
Lineaire vergrooting: 600×.

Fig. 8. Bacterium herbicola. Stam No. 2. Ciliën.
Lineaire vergrooting: 600×. (Penteekening).

Fig. 9. Bacterium herbicola. Rood klaverzaad. Ciliën.
Lineaire vergrooting: 600×. (Penteekening).

Fig. 10. Inrichting der plantproef van (serehzieke) bibits.

Fig. 11. Inrichting der opzuigproef.

Fig. 12. De aantasting der vaatbundels in de stengelknoopen („serehknoopen") van de rietvariëteit SW 16 als resultaat van de opzuigproef met Bact. herbicola (stam No. 2) na omstreeks 2 dagen.

Fig. 13. De roode verkleuring in dwarsdoorsneden van het suikerriet na ongeveer 3 dagen bij 30° C. (Schematisch).

Fig. 14. De roode verkleuring in lengtedoorsneden van het suikerriet na ongeveer 3 dagen bij 30° C. (Schematisch).

Fig. 15. Twee aangetaste planten (links) en twee gezonde contrôleplanten (rechts) uit de kultuurproef met geïnfecteerde bibits van de rietvariëteit 247 B. (Bact. herbicola, stam No. 15).

Fig. 16. Gedeeltelijk doorgesneden stengels van één der aangetaste rietplanten uit de kultuurproef met geïnfecteerde bibits van de rietvariëteit 247 B. (Bact. herbicola, stam No. 16).

INHOUD.

Pag.

Inleiding 321

Hoofdstuk I. VROEGERE ONDERZOEKINGEN OVER HET VOORKOMEN VAN MIKROBEN IN UITERLIJK NORMALE PLANTEN. 325

§ 1. Het inwendige van levende plantenweefsels bevat als regel geen mikro-organismen 325

§ 2. Symbiose van hoogere planten met daarin voorkomende mikro-organismen 329

§ 3. Het voorkomen van mikro-organismen in doode weefselelementen van hoogere planten 332

Hoofdstuk II. OVERZICHT VAN VROEGERE ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE SEREHZIEKTE. 336

Hoofdstuk III. DE TOEPASSING VAN DE GELATINEKWEEKMETHODE IN DE TROPEN. 344

§ 1. De noodzakelijkheid van het gebruik van gelatine naast agar-agar 344

§ 2. De bruikbaarheid van de gelatinekweekmethode in de tropen 345

Hoofdstuk IV. DE GEVOLGDE METHODIEK VOOR HET ONDERZOEK NAAR MIKROBEN IN HET SUIKERRIET. 347

§ 1. Algemeen overzicht der gevolgde methode 347

§ 2. Aseptische werkwijze voor het uitsteken van een monster uit het inwendige van den rietstengel 348

§ 3. De sapmonsterneming met behulp van de open pers . . 349

§ 4. De sapmonsterneming met behulp van de gesloten pers . 350

§ 5. Contrôle op de doeltreffendheid van de maatregelen ter voorkoming van infectiën 352

§ 6. Het aantoonen van mikroben in het perssap door kweeking op kultuurplaten 355

§ 7. Het aantoonen van mikroben in het perssap door kweeking in kultuurvloeistoffen. 356

Hoofdstuk V. HET VOORKOMEN VAN BACTERIËN IN STENGELS VAN HET NORMALE SUIKERRIET. 357

§ 1. Overzicht van de voor het onderzoek gebruikte uiterlijk normale rietstengels 357

§ 2. Uitkomsten van het onderzoek. 357

Hoofdstuk VI. HET VOORKOMEN VAN BACTERIËN IN STENGELS VAN HET SEREHZIEKE SUIKERRIET. 362

§ 1. De diagnose: serehziek der voor het onderzoek te gebruiken rietstengels. 362

§ 2. Het onderzoek der serehzieke stengels 364

§ 3. Overzicht der uitkomsten van het onderzoek der serehzieke stengels. 386

Hoofdstuk VII. DE EIGENSCHAPPEN VAN BACTERIUM HERBICOLA BURRI ET DÜGGELI. 387

§ 1. Literatuuroverzicht betreffende Bact. herbicola 387

§ 2. Overzicht van de voor het onderzoek gebruikte stammen van Bact. herbicola 388

Pag.
§ 3. Morphologische kenmerken 390
§ 4. Beschrijving van de op vaste voedingsbodems verkregen bacteriënkoloniën 399
§ 5. Optimumtemperatuur van de ontwikkeling 403
§ 6. De stofwisseling. 403
§ 7. Enzymatische stofwisselingsprocessen 413
§ 8. Vergelijking der eigenschappen van de geïsoleerde bacteriënstammen met Bacterium herbicola aureum (Burri et Düggeli) 429
Hoofdstuk VIII. DE BETEEKENIS VAN HET VOORKOMEN VAN BACTERIUM HERBICOLA IN HET SEREHZIEKE SUIKERRIET. 431
§ 1. De oekologie van Bact. herbicola 431
§ 2. Beschouwing omtrent de waarde, toe te kennen aan het feit, dat bij de gevolgde werkwijze Bact. herbicola regelmatig in het serehzieke riet kon worden aangetoond . . 433
§ 3. Het samengaan van het optreden van het serehsymptoom der roode vaatbundels en het verschijnen van Bact. herbicola in den jeugdigen rietstengel 435
§ 4. Bestaat er aanleiding om in Bact. herbicola de verwekker der serehziekte te vermoeden? 440
Hoofdstuk IX. PROEFNEMINGEN MET HET OPZUIGEN VAN REINKULTUREN VAN BACTERIUM HERBICOLA IN GEZONDE BEBLADERDE RIETSTENGELS. 443
Hoofdstuk X. HET SEREHSYMPTOOM DER ROODE VAATBUNDELS. 447
§ 1. De roode verkleuring der vaatbundels, veroorzaakt door andere mikroben dan Bact. herbicola 447
§ 2. Mikroskopisch onderzoek van de bij de opzuigproeven verkregen roodgekleurde vaatbundels 451
§ 3. De roode verkleuring der vaatbundels kan door uiteenloopende chemicaliën worden bewerkstelligd 451
§ 4. De roode verkleuring van het suikerriet opgevat als nekrobiotisch proces 455
§ 5. Verdere waarnemingen over de roode verkleuring van het suikerriet door mikrobenwerking 457
§ 6. Een onderzoek naar den aard van de door nekrobiose in het suikerriet gevormde roode kleurstof 458
Hoofdstuk XI. INFECTIEPROEVEN VAN SUIKERRIET MET REINKULTUREN VAN BACTERIUM HERBICOLA. 463
§ 1. De roode verkleuring der vaatbundels is geen specifiek symptoom der serehziekte 463
§ 2. Infectieproeven met reinkulturen van Bact. herbicola . . 464
§ 3. Bespreking der resultaten van de infectieproeven . . 469
Hoofdstuk XII. OPMERKINGEN VAN ALGEMEENEN AARD OVER DE SEREHZIEKTE. 470
§ 1. Beschouwingen over den invloed van uitwendige omstandigheden op het optreden der serehziekte 470
§ 2. Proefnemingen over het kweeken van geheel normaal riet uit serehzieke bibit 472
§ 3. Slotbeschouwing. 477
Overzicht der resultaten 479

HUMANITAS VINCIT IRA